

国家自然科学基金创新研究群体项目
(20521503) 资助出版

生物分析化学

鞠熀先　邱宗荫　丁世家 等　著

科 学 出 版 社
北 京

内 容 简 介

生物分析化学作为分析化学与生命科学交叉过程中形成的一个新的学科分支，自20世纪90年代以来取得了迅速发展，已经成为生命科学研究中的重要组成部分。光谱、色谱、质谱、电分析化学、电泳以及它们的联合应用构成了生命科学研究中不可或缺的技术平台。对生命体系自身的各种化学、物理和生物过程的研究，将在更大程度上依赖于新的分析测试和表征技术、方法的建立与发展。

本书概括了十多位作者在生物分析化学相关领域十多年来的教学实践和科学研究经验和成果，对生物分析化学新技术进行了全面、系统、深入浅出的阐述，并对各方面的应用做了详细介绍。

全书分14章，内容包括生物分子的结构与分析、生物样品的制备、液相柱色谱技术、电泳技术、生物质谱分析法、微流控分析、免疫分析与印迹技术、生物传感与DNA阵列、核酸扩增和序列分析、蛋白质、多肽的氨基酸组成及序列分析、蛋白质组分析、代谢组学、生物信息学、细胞分析化学方面。

本书适合于从事生命科学、化学、环境科学及材料科学领域的科技工作者，可用作大专院校临床检验诊断学、生物化学、化学专业高年级学生，以及分析化学、药物分析、生物化学、食品化学及相关专业研究生的教学参考书或教材。

图书在版编目(CIP)数据

生物分析化学 / 鞠熀先等著.—北京：科学出版社，2007

ISBN 978-7-03-018349-1

Ⅰ.生… Ⅱ.鞠… Ⅲ.生物化学-化学分析 Ⅳ.Q5

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第028650号

责任编辑：黄 海 李久进 沈晓晶 / 责任校对：钟 洋

责任印制：钱玉芬 / 封面设计：陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年3月第 一 版 开本：B5(720×1000)

2007年3月第一次印刷 印张：41 1/4

印数：1—3 000 字数：794 000

定价：78.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换〈环伟〉)

《生物分析化学》编写人员

第1章	刘北忠　鞠熀先
第2章	邱宗荫
第3章	邱　峰
第4章	于　超
第5章	丁世家
第6章	夏兴华　何风云
第7章	鞠熀先　欧阳瑞镯
第8章	刘松琴　鞠熀先
第9章	尹一兵　罗进勇
第10章	丁　敏　易　钢
第11章	邱宗荫　颜玉蓉
第12章	丁　敏　张晓清
第13章	马永平　邱宗荫
第14章	鞠熀先　丁　霖

前　　言

分析化学是人们获得物质组成和结构信息的科学，这些信息对于生命科学、材料科学、环境科学和能源科学来说都是必不可少的。

生物分析化学作为分析化学与生命科学交叉过程中形成的一个新的学科分支，自20世纪90年代以来取得了迅速发展，已经成为生命科学研究中的重要组成部分。光谱、色谱、质谱、电分析化学、电泳以及它们的联合应用构成了生命科学研究中不可或缺的技术平台，在核酸、蛋白质、多肽、糖与外源性及内源性生物小分子的研究中发挥着越来越重要的作用。同时，生物分析化学的研究成果，又极大地丰富了传统分析化学的内涵，促进了它的快速发展。对人类健康和社会经济发展产生重大影响的人类基因组计划，就是因为首先重视了分析测试方法学，尤其是建立和发展了快速、准确、高通量的基因测序方法，才从根本上保证了这一科学工程的提前完成。可以说，基因检测的研究带动了20世纪整个生命科学的迅速发展。另一个例子是1990年Manz在硅片上组装微型液相色谱装置，形成了微全分析系统(μTAS)研究领域。该技术反映了分析检测的微型化、集成化、整体化和自动化的发展趋势，在短短的十余年中已发展成为当前世界科技前沿领域之一，在生命科学研究领域中也日益受到重视。

21世纪是生命科学的时代，生命科学的发展为分析化学的发展提供了前所未有的机遇和挑战。对生命体系自身的各种化学、物理和生物过程的研究，将会在更大程度上依赖于新的分析测试平台的建立与发展。从分子水平上进行人类疾病相关基因和蛋白质的识别与鉴定、疾病相关基因和蛋白质的结构与功能研究、与疾病防治有关的基因和蛋白质表达的调控、环境致毒元素的致毒机制的阐明与控制、新型药物的药理与代谢机制的研究等都迫切需要新的分析测试方法与表征技术来获取生命物质形成和转化过程中的相关信息。但是，由于生命体系在组成和相互作用两个方面的高度复杂性，生命科学研究也向生物分析化学提出了苛刻的要求。高分辨率的分离技术，超高灵敏度、宽动力学范围的检测技术，实时、原位的表征技术，生物分子相互作用的解析技术等将是今后生物分析化学的重要发展方向。因此，生物分析化学已成为当今分析化学学科的重要前沿领域与多学科、多技术交叉的会聚点。

当今，美国、英国、德国、法国和日本等世界强国为争取21世纪战略格局的主动权，正在进行一场以生命科学前沿研究和生物高技术为中心之一的竞争和较量。竞争的核心首先是生命科学的测试技术与装备，因为它是生命科学领域一切原始

性创新的源头和基础。

由于在生命分析测试技术方面的相对劣势,我国在生命科学的研究中往往不得不依赖国外先进的检测技术。这种依赖发达国家的情况难免会让我国成为世界生命科学与技术强国之路困难重重。改变这种状况的根本措施之一是培养新一代具有创新能力的年轻的生物分析化学专门人才。为此,我们根据自身的科研工作积累,围绕因生命科学研究需要而发展起来的相关新技术编写了本书,希望通过本书能够系统、完整地介绍生物分析化学的内容和进展。一方面,可以帮助生命科学相关专业的科技工作者熟悉现代分析化学的理论和方法,以及在具体的研究工作中提高运用这些理论和方法的能力;另一方面,也有助于化学专业的科技工作者运用分析化学的基础理论和方法去认识和解决生命科学领域中各种生物活性物质定性、定量问题。

本书介绍了生物分析化学的基础知识、基本方法和近十多年来的发展,综述了分析化学与材料科学、信息科学、生命科学等学科的交叉、渗透,内容涉及生物分析化学的各个前沿领域,包括生物技术和纳米材料科学,以及医疗卫生、临床检验等领域,涉及生物物质的结构和性质,生物样品的制备、分离与分析方法,微流控分析,分子识别,蛋白质组学,代谢组学,生物信息学和细胞分析化学等方面。全书结合了作者们在多个领域研究的心得与成果,其中不乏原创性成果,内容深入浅出,对生命科学、信息科学、材料科学、环境科学等研究领域与临床检验诊断学的发展均具有重要的学术价值。

本书由重庆医科大学医学检验系、南京大学生命分析化学教育部重点实验室和东南大学化学化工学院部分专家共同完成,在此我们对他们的贡献表示感谢!在本书出版之际,我们要感谢国家自然科学基金委员会对相关研究工作给予的资助!

由于我们的水平有限,经验不足,且该领域的发展极快,错误及不妥之处在所难免,恳请读者批评指正。

鞠熀先　邱宗荫　丁世家

2006 年 5 月 18 日于重庆

目　　录

第 1 章　生物分子的结构与分析

生物体内的各种有机分子均称生物分子(biomolecule),包括蛋白质、核酸、糖、脂类、维生素与激素等。按其相对分子质量大小,可分为生物小分子和生物大分子。其中,多糖、蛋白质与核酸是分别由多个基本结构单位——单糖、氨基酸和核苷酸,按照一定的排列顺序和连接方式而形成的重要的生物大分子[1]。本章主要介绍蛋白质、核酸和糖的结构与性质,生物分子的结构和性质特点与差异是人们对其进行分离与分析的基础。只有在充分认识其结构与性质的基础上,才可以建立各种生物分析化学的方法和技术,并通过这些方法和技术,对其做进一步的研究和深入的了解。

1.1　氨基酸、多肽与蛋白质

蛋白质是生物功能的主要载体,而氨基酸是肽和蛋白质组成的结构单位,相对分子质量在 100～200 之间,在生物体代谢过程中起重要作用。从各种生物体中发现的氨基酸现已有 180 多种,但是参与肽与蛋白质组成的常见氨基酸只有 20 种,而且都是 α-氨基酸。这 20 种不同氨基酸通过肽键相连,并排列组合形成成千上万种的肽和蛋白质。一般来讲,10 个以内的氨基酸组成的短链称寡肽,10 个以上的氨基酸组成的短链称多肽,而上千个氨基酸组成的长链称蛋白质。氨基酸的排列顺序决定了多肽和蛋白质的结构和功能。

1.1.1　氨基酸

自然界中存在的成千上万种蛋白质[2],在结构和功能上的惊人的多样性归根结底是由于 20 种常见氨基酸的内在性质、排列顺序和空间结构的差异造成的。这些性质包括:①聚合能力;②特有的酸碱性质;③侧链的结构及其化学功能的多样性;④手性(甘氨酸除外)。

氨基酸的基本结构(图 1.1)是由碳原子(α-C)连接 4 个不同的基团形成的四面体。4 个基团分别为:氨基(—NH_2)、羧基(—COOH)、氢原子(—H)和可变的取代基团(—R)。其中,氨基相对于羧基在 α 位的称为 α-氨基酸。取代基团可以是氨基酸或其他物质,各种氨基酸的区别就在于取代基团的不同。除最简单的甘氨酸(R 基团为氢原子)外,其他氨基酸均为手性氨基酸,因此都有旋光

H
HOOC—C^{α}—R
NH_2

图 1.1　α-氨基酸的基本结构

性。按 Fisher 规则,所有组成蛋白质的天然氨基酸均为 L-型氨基酸;而按 Cahn-Ingold-Prelog 规则,除了半胱氨酸为 R-型氨基酸外,其余均为 S-型氨基酸。D-型氨基酸主要存在于一些微生物产生的抗生素和个别植物体内的生物碱中。

根据 R 基团的不同,氨基酸可分为碱性氨基酸(R 基团含有氨基)、酸性氨基酸(R 基团含有羧基)以及脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸、含硫氨基酸、含羟氨基酸和亚氨基酸(图 1.2～图 1.8)。

赖氨酸　精氨酸　组氨酸

图 1.2　碱性氨基酸

天冬氨酸　天冬酰胺　谷氨酸　谷氨酰胺

图 1.3　酸性氨基酸

甘氨酸　亮氨酸　丙氨酸　异亮氨酸　缬氨酸

图 1.4　脂肪族氨基酸

苯丙氨酸　酪氨酸　色氨酸

图 1.5　芳香族氨基酸

半胱氨酸　　蛋氨酸

图 1.6　含硫氨基酸

丝氨酸　　苏氨酸

图 1.7　含羟氨基酸

脯氨酸

图 1.8　亚氨基酸

氨基酸的命名通常用三字符或一字符表示。例如，精氨酸可用 Arg 或 R 表示，甘氨酸可用 Gly 或 G 表示。20 个天然氨基酸的简写式见表 1.1。这些天然氨基酸是构成肽链和蛋白质的基本单位。在组成蛋白质的氨基酸中，特殊氨基酸不超过 10%。

表 1.1　天然氨基酸的分类、命名、简写符与基本参数

分类及命名	三字简写符	一字简写符	相对分子质量	含量/%	pK_1 α-COOH	pK_2 α-NH_3^+
碱性氨基酸						
赖氨酸(lysine)	Lys	K	146.2	5.9	2.16	9.06
组氨酸(histidine)	His	H	155.2	2.3	1.8	9.33
精氨酸(arginine)	Arg	R	174.2	5.1	1.82	8.99
酸性氨基酸						
天冬氨酸(aspartic acid)	Asp	D	133.1	5.3	1.99	9.90
谷氨酸(glutamic acid)	Glu	E	147.1	6.3	2.10	9.47
天冬酰胺(asparagine)	Asn	N	132.1	4.3	2.14	8.72
谷氨酰胺(glutamine)	Gln	Q	146.2	4.3	2.17	9.13
脂肪族氨基酸						
甘氨酸(glycine)	Gly	G	75.1	7.2	2.35	9.78
丙氨酸(alanine)	Ala	A	89.1	7.8	2.35	9.87
缬氨酸(valine)	Val	V	117.2	6.6	2.29	9.74
亮氨酸(leucine)	Leu	L	131.2	9.1	2.33	9.74
异亮氨酸(isoleucine)	Ile	I	131.2	5.3	2.32	9.76

续表

分类及命名	三字简写符	一字简写符	相对分子质量	含量/%	pK_1 α-COOH	pK_2 α-NH_3^+
芳香族氨基酸						
苯丙氨酸(phenylalanine)	Phe	F	165.2	3.9	2.20	9.31
酪氨酸(tyrosine)	Tyr	Y	181.2	3.2	2.20	9.21
色氨酸(tryptophan)	Trp	W	204.2	1.4	2.46	9.41
含硫氨基酸						
半胱氨酸(cysteine)	Cys	C	121.2	1.9	1.92	10.70
蛋氨酸(methionine)	Met	M	149.2	2.2	2.31	9.28
含羟氨基酸						
丝氨酸(serine)	Ser	S	105.1	6.8	2.19	9.21
苏氨酸(threonine)	Thr	T	119.1	5.9	2.09	9.10
亚氨基酸						
脯氨酸(proline)	Pro	P	115.1	5.2	1.95	10.64

根据氨基酸在生理 pH 范围(6～7)的极性和电荷可分为:①中性非极性氨基酸,包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、蛋氨酸和脯氨酸;②中性极性氨基酸,其取代基因含有极性基团,包括甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸;③带正电荷氨基酸,包括缬氨酸、组氨酸和精氨酸;④带负电荷氨基酸,包括天冬氨酸和谷氨酸。

由于氨基酸含酸性和碱性的功能基团,所以氨基酸是一种两性电解质。氨基酸羧基的 pK 值介于 1.8～2.5 间,氨基的 pK 值介于 8.7～10.7 间(表 1.1)。在生理条件(pH6～7)的环境下,氨基解离为—NH_3^+,羧基解离为—COO^-。因此在 pH6～7 的情况下,氨基酸为两性离子。pH 较低时,羧基结合质子成为—COOH,氨基酸带正电。pH 较高时,氨基去质子成为—NH_2,氨基酸带负电(见图 1.9)。R 基团所含的功能基团也可有不同的 pK 值(表 1.1)。

$$\underset{\text{pH1}}{H{-}\overset{NH_3^+}{\underset{R}{C}}{-}COOH} \underset{H_3O^+}{\overset{OH^-}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{pH7}}{H{-}\overset{NH_3^+}{\underset{R}{C}}{-}COO^-} \underset{H_3O^+}{\overset{OH^-}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{pH11}}{H{-}\overset{NH_2}{\underset{R}{C}}{-}COO^-}$$

图 1.9　氨基酸的两性离子特性

每个氨基酸都有使其成为电中性的特定 pH,这个 pH 称为等电点(pI)。氨基酸处于等电点时,在电场环境中保持静止,不会向阳极或者阴极移动。等电点的值

可以通过 Henderson-Hasselbalch 方程计算：

$$pI=\frac{1}{2}(pK_i+pK_j) \tag{1.1}$$

式中，pK_i 和 pK_j 是参与电离的电离常数。该方程只适用于带有一个氨基和一个羧基的氨基酸，其中 pK_i 和 pK_j 分别为氨基和羧基的 pK 值。如果氨基酸带有可电离的侧链，pI 值的计算将更加复杂。天然氨基酸的 pI 值见表 1.2。一些蛋白质的 pI 值见表 1.3。由于各个氨基酸 pI 值的不同，使各氨基酸或蛋白质在电场中得以分离，该技术称为等电聚焦，将在以后章节中详细讲解。

表 1.2　天然氨基酸的 pI 值

中性非极性氨基酸	pI 值	中性极性氨基酸	pI 值	带电荷的氨基酸	pI 值
丙氨酸	6.02	甘氨酸	5.97	赖氨酸	9.74
缬氨酸	5.97	天冬酰胺	5.41	组氨酸	7.58
亮氨酸	5.98	谷氨酰胺	5.65	精氨酸	10.76
异亮氨酸	6.02	酪氨酸	5.65	天冬氨酸	2.87
苯丙氨酸	5.98	半胱氨酸	5.02	谷氨酸	3.22
色氨酸	5.88	丝氨酸	5.68		
蛋氨酸	5.75	苏氨酸	6.53		
脯氨酸	6.10				

表 1.3　某些蛋白质的 pI 值

蛋白质	pI 值	蛋白质	pI 值
胃蛋白酶	<1.0	马肌红蛋白	7.0
鸡卵清蛋白	4.6	人血红蛋白	7.1
人血清蛋白	4.0	牛核糖核酸酶 A	7.8
原肌球蛋白	5.1	马细胞色素 c	10.6
牛胰岛素	5.4	牛组蛋白	10.8
人纤维蛋白原	5.8	鸡溶菌酶	11.0
人 γ-球蛋白	6.6	鲑精蛋白	12.1
胶原蛋白	6.6		

1.1.2　肽与蛋白质

肽和蛋白质是由氨基酸通过肽键头-尾相连形成长链而组成的生物大分子。蛋白质的三维构象已经明确，并在蛋白质的功能中发挥着不可替代的作用。蛋白质存在于所有形式的生命体中，执行多种多样的任务。本章将对蛋白质的结构和功能进行简要介绍。

1. 蛋白质的生物学功能

总体上，蛋白质的结构可分为两类：①纤维状、线形的蛋白质，此类蛋白质不溶于水，起结构支撑的作用；②球状、球形的蛋白质，此类蛋白质可溶于水，在免疫系统和机体代谢中有着特殊的作用。

球状蛋白结构紧凑，呈圆形，表面有许多特征性的凹沟和突起[3]。类似锁和钥匙，其他的分子可以嵌合在凹沟和突起中。这种结构使得球状蛋白在与其他分子相互作用和识别时具有特异性(图 1.10)。例如，酶就是这种蛋白质，具有生物化学的催化活性。酶可以降低活化能，极大地加快生物反应的反应速率。酶和其底物相互作用，只有当底物的功能基团、氢键和构象都同酶的活性部位契合时才发生反应。例如，核糖核酸酶，这是一种由胰腺分泌的分解核糖核酸的特异性酶。抗体是另一种高特异性的球状蛋白质，可以识别外源性物质——抗原，并和它们以锁-钥匙的机械关系进行结合。酶和抗体在生物分析和生物传感器中都可作为分子识别元件。

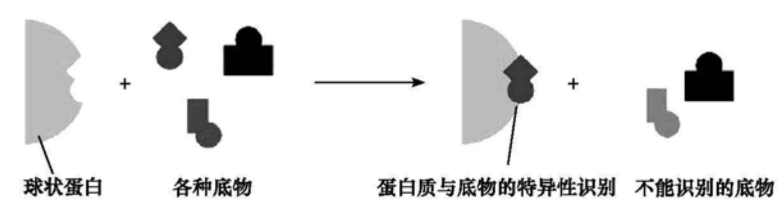


图 1.10　球状蛋白与底物的特异性识别

在机体内，蛋白质还具有运输和储存的功能。例如，血红蛋白在血液中携带氧分子，转铁蛋白进行铁的转运。铁蛋白作为有储存功能的蛋白质，在肝脏与铁形成复合物，结合并储存金属离子。激素是一种多肽物质，也具有化学信使的作用。它通过和细胞膜上的特异性受体结合，对机体代谢进行各种调节。例如，在胰腺中发现的胰高血糖素、胰岛素和生长激素释放抑制激素，就对血糖和脂肪酸的储存和释放进行调节。其他的激素控制着细胞的溶解、生长和分化。产生于各类生化物质的激素大部分是多肽，其他的是氨基酸衍生物和固醇类物质。

纤维状蛋白具有极大的拉伸度和生物化学的稳定性，其功能是对机体组织提供结构支持。例如，胶原蛋白使皮肤、骨骼、牙齿和肌腱具有连接力，角蛋白是头发和指甲的主要成分。

2. 蛋白质的结构

蛋白质并不是由肽链无序盘绕构成，许多分子间的相互作用使肽链以特定的方式折叠形成了蛋白质的特殊三维构象。这种结构与蛋白质的活性和功能有着密切的关系。一部分肽链可通过二硫键相互连接，另一部分则可形成螺旋或片层。

如酶和抗体这类球状蛋白容易折叠和盘绕，而纤维状蛋白更容易拉伸成丝状。为阐明蛋白质的复杂结构，必须先区分蛋白质的4种构象。

1）蛋白质的一级结构

在蛋白质分子中，从N端至C端的氨基酸排列顺序称为蛋白质的一级结构（primary structure）。氨基酸序列决定了蛋白质的一级结构，一级结构的主要化学键是肽键（peptide bond）。蛋白质中处于功能区域的一个氨基酸改变就会明显的影响蛋白质的活性和功能而引发疾病或机体的紊乱。氨基酸以头-尾相连形成肽键而彼此连接（图1.11）。肽链由于氨基和羧基的疏水作用而压紧。两个氨基酸通过肽键连接形成二肽，三个氨基酸通过肽键连接形成三肽，以此类推。随着序列中氨基酸数量的增多，可将肽链分为寡肽和多肽。由于C—N键具局部双键特性，所以不能旋转（图1.12），因此，肽单元中的NH—CO结合十分牢固。相邻连接的α-C的键在一定空间范围内可以旋转（图1.13），并在蛋白质的折叠中起重要作用。肽单元和C原子形成的四面体共同构成蛋白质的骨架，而R取代基称为侧链。

图1.11 两个氨基酸生成的肽键

图1.12 C—N键的双键特性

图1.13 刚性的C—N键和可以旋转的αC—N键

图1.14为4个氨基酸残基（丝氨酸-丙氨酸-半胱氨酸-甘氨酸）构成的肽。为了清楚地表示肽链的N端和C端，N端的第一位氨基酸残基总有一个自由氨基，写在左边。C端的最后一位氨基酸总有一个自由羧基，写在右边。

肽链也可有环形结构，像“咬住自己尾巴”一样。例如，钾离子载体与缬氨霉素等就属于这类肽。

20种天然的L-型氨基酸可有许多不同的排列组合。二肽有$20^2=400$种组合，三肽有$20^3=8000$种组合，100个氨基酸残基组成的小分子多肽就有$20^{100}=1.27\times10^{130}$种不同的排列组合。如果没有蛋白质测序技术的建立与发展，要推测

N端　HOH_2C … COO^-　C端

Ser　Ala　Cys　Gly

图 1.14　肽的氨基酸书写顺序

大分子蛋白质的氨基酸排列顺序,显然非常困难。

各种生物体内种类繁多的蛋白质,其一级结构各不相同。一级结构是蛋白质空间构象和特异性生物学活性与功能的基础,但并不是决定蛋白质空间构象的唯一因素。

2) 蛋白质的二级结构

蛋白质的二级结构(secondary structure)是指蛋白质分子中某一段肽链的局部空间结构,也就是该段肽链主链骨架原子的相对空间位置,并不考虑氨基酸残基侧链的构象。二级结构是在蛋白质氨基酸序列中相对小的片段形成的规则的结构,如 α 螺旋和 β 折叠。这些结构的形成是与肽链骨架一致的。

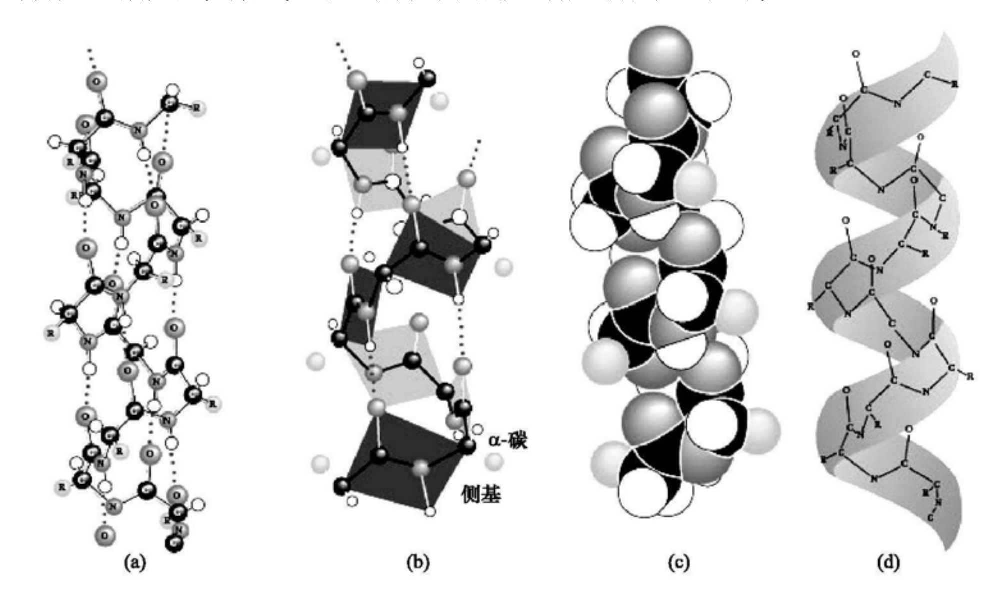


图 1.15　α 螺旋的四种结构示意图

α 螺旋(α-helix)是右手螺旋(图 1.15),由肽链中 N 端氨基酸残基的—CO 与第四个氨基酸残基的—NH 形成的氢键连接。螺旋中外伸的－R 基团与螺旋的中

心轴垂直。α 螺旋在某些结构蛋白质中非常重要。由于空间位阻,并非所有的氨基酸序列都能形成 α 螺旋。例如,第二个脯氨酸可能破坏螺旋的形成。

在 β 折叠(β-pleated sheet)片层结构中,多肽链折叠对齐,并通过氢键维系其结构。氨基酸 R 取代基伸向片层的上方或下方。相邻的侧链可在相同或相反方向成直线排列(平行 β 折叠和反平行 β 折叠),如图 1.16 所示。β 折叠常发生在带无电荷侧链的氨基酸处。

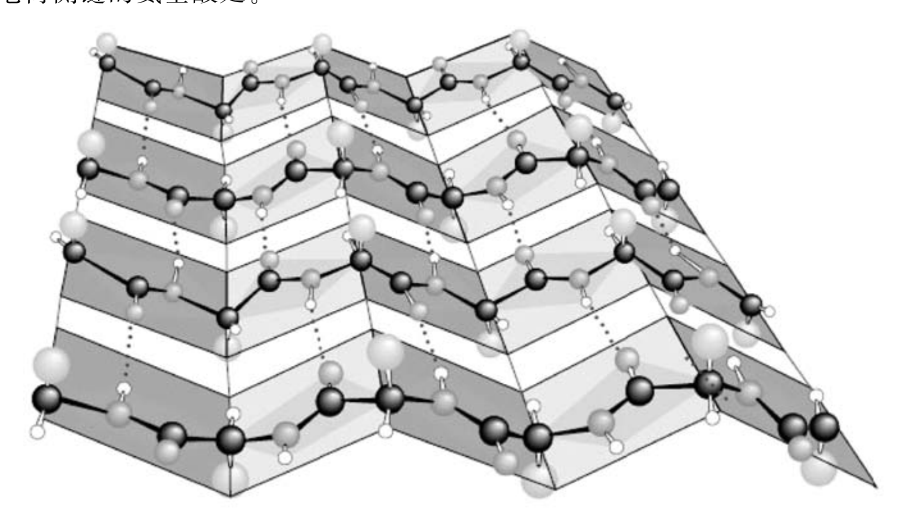


图 1.16　β 折叠的结构示意图

除 α 螺旋和 β 折叠外,蛋白质的二级结构还包括 β 转角(β-turn)和无规卷曲(random coil)。β 转角(图 1.17)常见于球蛋白。许多蛋白质都是球蛋白,它们常通过弯曲、转角才能够形成紧缩的球形结构。β 转角的结构较为特殊,第二个氨基酸残基常为脯氨酸,其他常见的还有甘氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和色氨酸。而无规卷曲是用来阐述还没有确定规律性的那部分肽链结构。

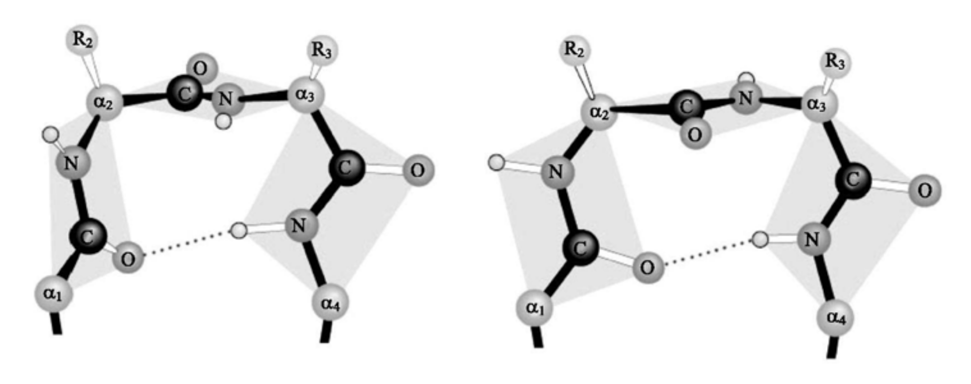


图 1.17　β 转角的结构示意图

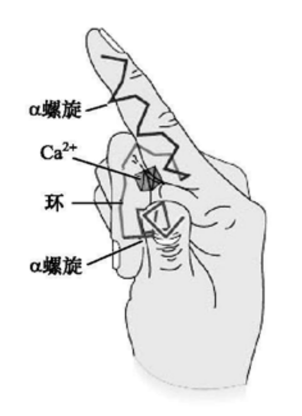


图 1.18 结合钙离子基序

在许多蛋白质分子中,可发现基序(motif)。基序是由两个或三个具有二级结构的肽段在空间上相互接近而形成的一种特殊的空间构象。一个基序总有其特征性的氨基酸序列,并发挥特殊的功能。常见的基序有结合钙离子基序(见图 1.18)和锌指结构(见图 1.19)。前者由 α 螺旋-环-α 螺旋三个肽段组成,环中可以容纳并结合一个钙离子,常见于钙结合蛋白;后者由一个 α 螺旋和两个反方向平行的 β 折叠共三个肽段组成,形似手指,具有结合锌离子的功能,同时由于二价锌离子可稳固基序中的 α 螺旋结构,致使此 α 螺旋能嵌入 DNA 的大沟中,因此,含锌指结构的蛋白质都能与 DNA 或 RNA 结合。

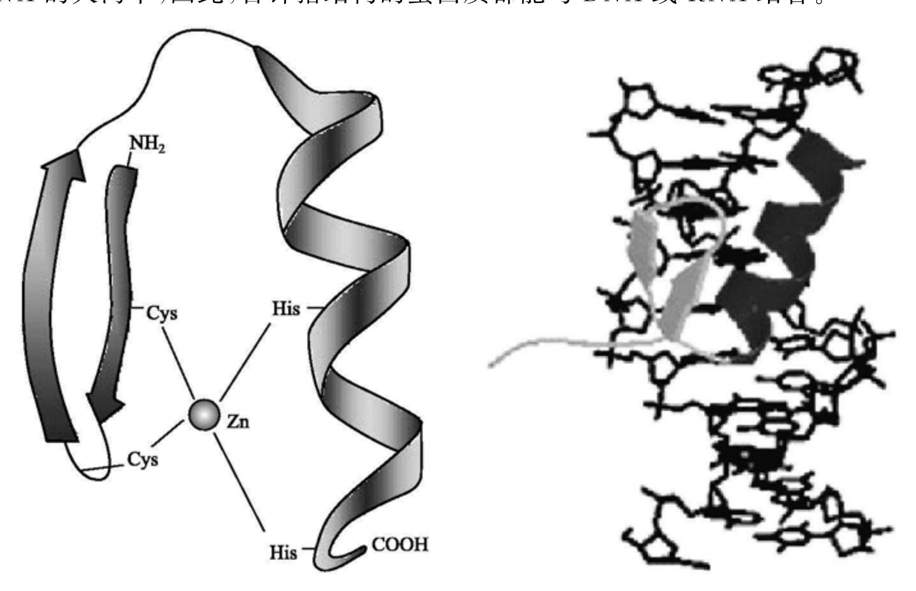


图 1.19 锌指结构及其与 DNA 的结合

3) 蛋白质的三级结构

三级结构是描述整个多肽链的完整三维结构,包括蛋白质的二级结构形成的不同结构域的关系和氨基酸侧链 R 基团的相互作用。如图 1.20 所示,牛的核糖核酸酶 A 是一种具有 α 螺旋和 β 折叠结构的蛋白质,周围环境的参数在一定范围内使蛋白质具有热力学稳定性以维持这种特殊的折叠,如合适的温度、pH 及离子强度。超出这些参数的一定范围,蛋白质将不能折叠而失活。

相对分子质量大的蛋白质，其三级结构常可分割成数个球状或纤维状的区域，这些区域折叠得较为紧密，分别行使其特定功能，称为结构域（domain）。如 Ca^{2+}-ATP 酶可划分为多个结构域（见图 1.21）。



图 1.20　具有 α 螺旋和 β 折叠结构的牛核糖核酸酶 A 的三级结构

4）蛋白质的四级结构

蛋白质可由两条或更多的多肽链构成。另外，非氨基酸成分也可成为蛋白质的组分，如金属离子、脂类、糖类。四级结构就是指这些肽链和非氨基酸成分如何通过氢键、静电吸引力和二硫键连接起来以及它们间的相互作用。二硫键由半胱氨酸的—SH 氧化形成（见图 1.22），该反应的产物是共价结合的二肽——胱氨酸。

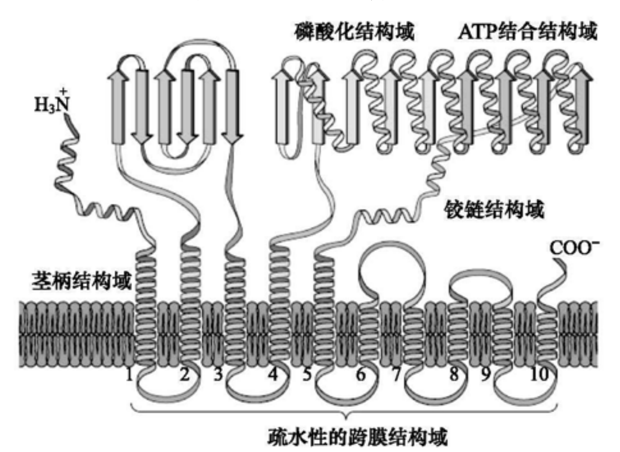


图 1.21　Ca^{2+}-ATP 酶

$$\begin{array}{c}COO^-\\|\\ {}^{+}H_3N-C-H\\|\\H_2C-SH\end{array} + \begin{array}{c}COO^-\\|\\ {}^{+}H_3N-C-H\\|\\HS-CH_2\end{array} \longrightarrow \begin{array}{cc}COO^- & COO^-\\| & |\\ {}^{+}H_3N-C-H & {}^{+}H_3N-C-H\\| & |\\H_2C-S & -S-CH_2\end{array}$$

半胱氨酸　　半胱氨酸　　胱氨酸

图 1.22　二硫键的形成

胰腺产生的胰岛素有两条不同的多肽链 A 和 B，二硫键的形成可在一条链内也可在两条链间（图 1.23）。构成蛋白质的多肽链可以是相同的，也可以是不同的

（如胰岛素）。

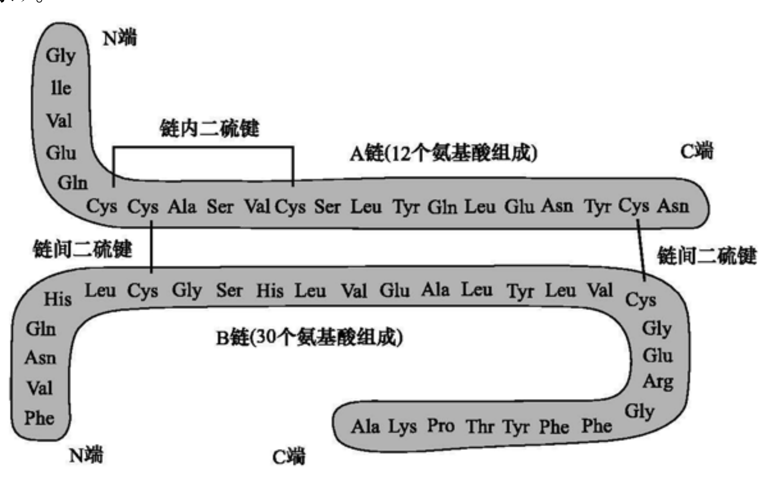


图 1.23　胰岛素链内与链间二硫键示意图

3. 蛋白质的变性

蛋白质的四级结构是通过氢键、静电引力、二硫键的作用紧密地结合在一起的，对化学和物理环境非常敏感。pH、温度或者离子强度的变化都会破坏这些作用从而使蛋白质不能折叠，这个过程叫做变性。一旦蛋白质不能维持正常结构就会失去活性。尽管多数情况下蛋白质的失活是永久性的，但有时其变性也是可逆的。蛋白质能够通过复性而恢复其活性。

1.2　核　　酸

核酸的基本结构单位是核苷酸，它是酸性大分子，在活细胞中大量存在，并与碱性蛋白结合，以核蛋白形式存在[4]。核酸是长的线性的生物活性大分子，分子质量可达几百万道尔顿。核酸有两种，脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）。DNA 中还有编码生命体的密码子。DNA 是遗传的物质基础，负责遗传信息的储存和发布，在细胞分化过程中 DNA 也在复制。RNA 负责遗传信息的表达，直接参与蛋白质合成。信使 RNA（mRNA）则由 DNA 转录而来，在细胞核中合成。细胞的蛋白质合成是在 mRNA 的帮助下由 DNA 来决定和控制的。转运 RNA（tRNA）转移氨基酸到细胞质中的确定位置来合成蛋白质。

1.2.1　核酸的结构

作为核酸基本结构单位的核苷酸由核苷和磷酸组成。核苷进一步分解成戊糖

和含氮碱基。构成DNA的戊糖是β-D-脱氧核糖，构成RNA的戊糖是β-D-核糖（图1.24）。含氮碱基包括嘌呤（purine）和嘧啶（pyrimidine），见图1.25和图1.26。DNA和RNA都含有腺嘌呤（adenine，A）和鸟嘌呤（guanine，G）。胸腺嘧啶（thymine，T）和胞嘧啶（cytosine，C）存在于DNA中，而尿嘧啶（uracil，U）和胞嘧啶（cytosine，C）存在于RNA中。核酸的有关组成总结见表1.4。由于碱基内的共轭双键，核酸和核苷酸均在波长240～290 nm有强烈的紫外吸收。

β-D-核糖　　β-D-脱氧核糖

图1.24　β-D-核糖与β-D-脱氧核糖

嘌呤　　腺嘌呤 (A)　　鸟嘌呤 (G)

图1.25　嘌呤结构

嘧啶　　胞嘧啶 (C)　　胸腺嘧啶 (T)　　尿嘧啶 (U)

图1.26　嘧啶结构

表1.4　核酸的成分组成

组成		DNA	RNA
碱基	嘌呤	腺嘌呤（A） 鸟嘌呤（G）	腺嘌呤（A） 鸟嘌呤（G）
	嘧啶	胸腺嘧啶（T） 胞嘧啶（C）	尿嘧啶（U） 胞嘧啶（C）
糖		β-D-脱氧核糖	β-D-核糖
磷酸		磷酸	磷酸

一个碱基和一个戊糖通过共价键连接成核苷[图 1.27(a)],在戊糖的 C1′原子和嘌呤碱的 N9 原子或嘧啶碱的 N1 原子之间形成 N 糖苷键。核苷酸由一个带有一个或几个磷酸基团的核苷与戊糖的 5′-羟基共价结合[图 1.27(b)]。在 pH 7 时,酸性磷酸基团带负电。核苷酸单元可以相互连接成一长链,即多聚核苷酸。磷酸残基与一个戊糖的 5′残基连接，与另一戊糖的 3′-羟基连接[图 1.28(a)]。其序列从起始位点

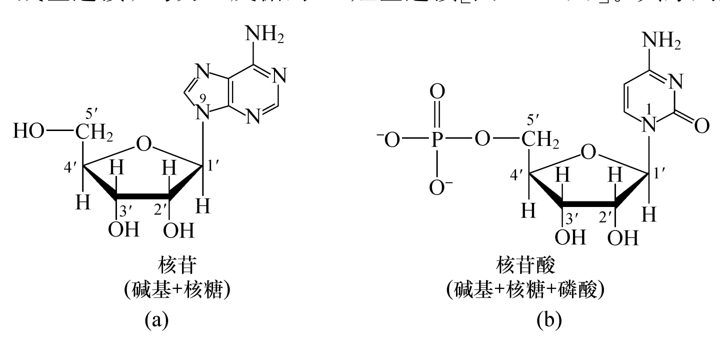


图 1.27　核苷与核苷酸

图 1.28　多聚核苷酸的结构及其简写式

到终止位点，可以书写成从 5′末端游离的磷酸基团到 3′末端游离的羟基，如：…pApGpCpT…，或…pAGCT…。如图 1.28(b)所示，也可用短线连接或以无戊糖和磷酸的碱基序列表示。

1. DNA 的三维结构

1953 年，Crick 和 Watson 发现了 DNA 的三维结构(图 1.29)。在细胞核中发现的 DNA 是两条多聚核苷酸链相互缠绕的右手双螺旋结构。这两条链方向相反，因此一条链的 3′末端与另一条链的 5′末端相连。由戊糖和磷酸基团构成的亲水骨架位于螺旋的外侧，而疏水的碱基则在螺旋的内侧，这些碱基平面相互平行并与中轴垂直，通过弱氢键相互连接，形成碱基对。作为线性长分子，DNA 并非刚性结构，否则无法存在于小小的细胞核中。根据分子的立体构象，只有两种碱基配对方式，即腺嘌呤与胸腺嘧啶(A-T)配对和鸟嘌呤与胞嘧啶(G-C)配对(图 1.30)。

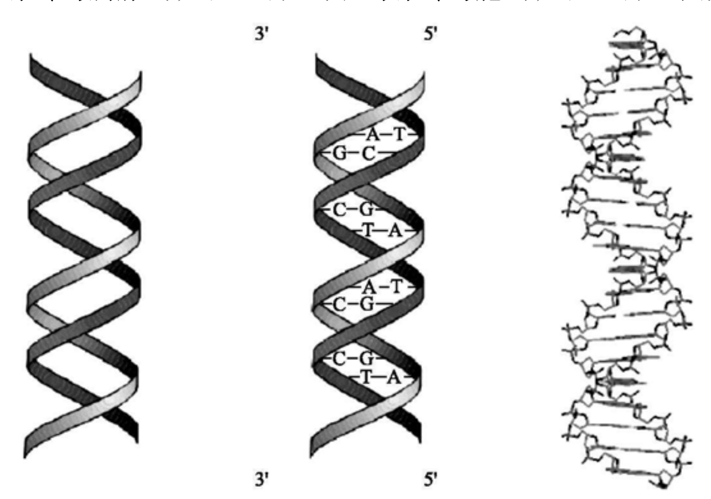


图 1.29　DNA 的右手双螺旋结构

图 1.30　DNA 的碱基配对

如图 1.31 所示，DNA 分子螺旋结构的直径为 2 nm，每旋转一周包含了 10 对碱基，每个碱基的旋转角度为 36°，螺距为 3.4 nm，每个碱基平面之间的距离为 0.34 nm。从外观上看，DNA 双螺旋分子表面存在一个大沟（major groove）和一个小沟（minor groove），目前认为这些沟状结构与蛋白质和 DNA 的识别有关。由数百万个核苷酸组成的 DNA 分子，拉直了只有几厘米长。双螺旋的两条链是互补的，由一条链的碱基序列可以推测出另一条链的碱基序列。

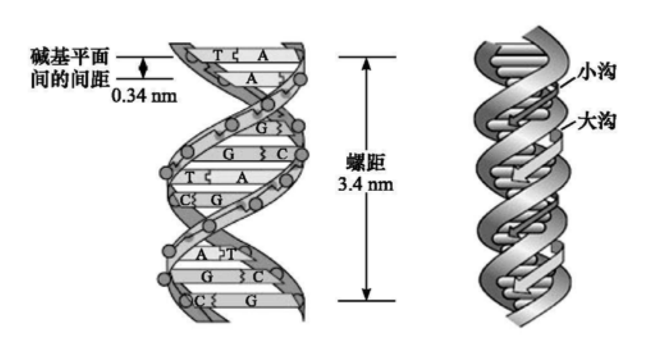


图 1.31　DNA 右手双螺旋结构的基本参数与沟状结构

需要指出的是，上述 DNA 右手双螺旋结构的基本参数是在一定的条件下测定的，并非一成不变。在离子强度和相对湿度等条件改变的情况下，其螺距、旋转角度、沟的深浅等参数都会有所变化。另外，除右手螺旋结构外，天然 DNA 分子也有左手螺旋的结构形式。目前，人们将上述 Crick 和 Watson 模型结构称为 B-DNA，左手螺旋结构称为 Z-DNA，而右手螺旋结构中也有螺距更短（2.46 nm）的 A-DNA（图 1.32），反映了 DNA 双螺旋结构的多样性。

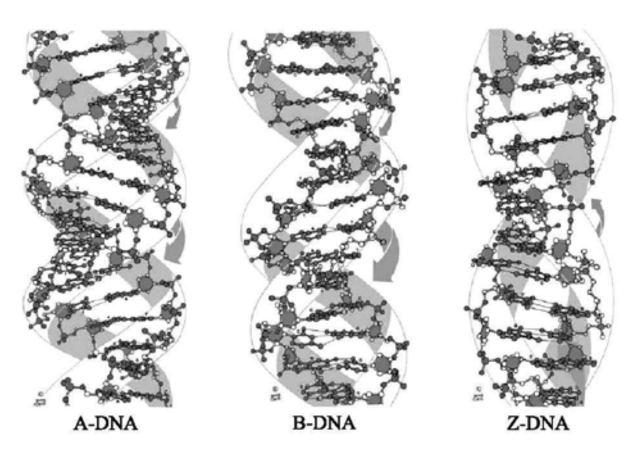


图 1.32　DNA 双螺旋结构的多样性

类似蛋白质的三级结构，DNA 分子也具有不同的三级结构。一级结构即核苷酸排列顺序，通常按其所含的碱基序列书写；二级结构即双螺旋结构；三级结构则由双螺旋发生进一步的扭转、折叠和盘绕而形成。

与蛋白质相比，DNA 是个相当简单的分子，仅含有 4 种核苷酸，且双螺旋结构是其仅有的结构组分。

当 DNA 被加热到 95℃或偏离其生理条件时，DNA 双链中的氢键断裂，双螺旋 DNA 解旋为两条单链。这种变性通常是可逆的。当温度降低或恢复其生理条件时，两条单链会重新形成双螺旋结构。DNA 复制中 DNA 变性成单链是必需的步骤，一旦解链，就可以合成互补的子链，从而完成 DNA 的复制。DNA 变性也是细胞核中 mRNA 合成及 DNA 扩增所必需的。

2. RNA 的三维结构

RNA 也是一种多聚核苷酸，但其戊糖是核糖，它的碱基没有胸腺嘧啶，而替代以尿嘧啶。由于在脱氧核糖分子上多了一个羟基，以致立体位阻太大而不能形成双链结构，RNA 仅以单链形式存在。RNA 单链能够折叠、环化并在局部形成碱基对。

RNA 分子比 DNA 分子小许多，由于功能的多样性，其种类、大小和结构都远比 DNA 多样化，主要包括信使 RNA（mRNA）、转运 RNA（tRNA）和核糖体 RNA（rRNA），分别占 RNA 总量的 2%、16%和 83%。其他还有不均一核 RNA、核内小 RNA、胞质小 RNA 等（表 1.5）。

表 1.5 动物细胞内主要的 RNA 种类及功能

RNA 种类	细胞核与细胞质	线粒体	功能
信使 RNA	mRNA	mt mRNA	蛋白质合成模板
转运 RNA	tRNA	mt tRNA	氨基酸的转运
核糖体 RNA	rRNA	mtRNA	核蛋白体组分
不均一核 RNA	hnRNA	——	成熟 mRNA 前体
核内小 RNA	snRNA	——	参与 hnRNA 的剪接转运
核仁小 RNA	snoRNA	——	rRNA 的加工与修饰
胞质小 RNA	scRNA/7SL-RNA	——	参与蛋白合成的信号识别等
催化性小 RNA	cRNA	——	即核酶，具有催化作用
小片段干扰 RNA	siRNA	——	通过降解 mRNA 参与表达调控

真核生物 mRNA 的结构特点是 5′末端含有帽子结构和 3′末端含有尾巴结构。大多数真核生物 mRNA 的 5′末端以 7-甲基鸟嘌呤-三磷酸鸟苷（m^7GpppN）为起始结构，这种结构被称为帽子结构（cap sequence）。在真核生物 mRNA 的 3′

末端，大多数有一段由数十个至几百个不等腺苷酸连接而成的多聚腺苷酸结构，称为多聚 A 尾巴[poly(A)]。

所有 tRNA 均有类似的结构：①含稀有碱基，除 A、U、G、C 外，还可含有双氢尿嘧啶(DHU)、假尿嘧啶(ψ)和甲基化的嘌呤(^{m}G 和^{m}A)等。tRNA 中的稀有碱基占总碱基数量的 10%～20%；②形成茎环结构或发夹结构，由于茎环结构的存在，整个 tRNA 分子的形状如同三叶草形，包括 DHU 环、TψC 环和反密码环；③分子末端含氨基酸接纳茎，是氨基酸的结合部位，不同氨基酸接纳茎可结合不同的氨基酸；④tRNA 序列中含反密码子，不同的 tRNA 具有不同的反密码子，反密码子通过与模板 mRNA 上的密码子互补识别，使 tRNA 转运氨基酸进行蛋白质的生物合成。

rRNA 是细胞内含量最多的 RNA，约占总 RNA 的 80%以上。rRNA 与核蛋白体蛋白构成核蛋白体或称核糖体，为肽链合成所需的 mRNA、tRNA 以及多种蛋白因子提供了相互结合位点和相互作用空间，是细胞内蛋白质合成的场所。

1.2.2　蛋白质的合成

DNA 的一个最主要的任务就是起始蛋白质的合成[5]。首先，DNA 双螺旋展开，并通过转录(transcription)合成 mRNA。然后 mRNA 离开细胞核并被转运到核糖体上。在核糖体上，tRNA 转运多肽合成所必需的氨基酸。mRNA 中每三个碱基为一组的碱基序列(即密码子)决定了肽序列中氨基酸的排列顺序，从而通过这种翻译(translation)过程合成相应的多肽或蛋白质(图 1.33)。有关密码子编码的氨基酸见表 1.6。

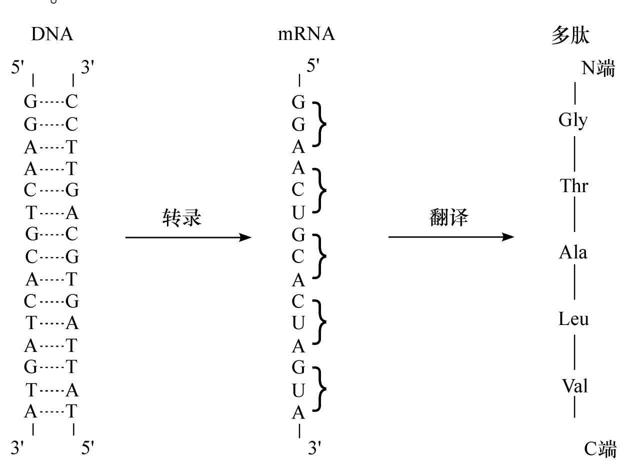


图 1.33　多肽的合成过程

表 1.6　遗传密码表

第一核苷酸 (5′)	第二核苷酸 U	C	A	G	第三核苷酸 (3′)
U	UUU 苯丙氨酸	UCU 丝氨酸	UAU 酪氨酸	UGU 半胱氨酸	U
	UUC 苯丙氨酸	UCC 丝氨酸	UAC 酪氨酸	UGC 半胱氨酸	C
	UUA 亮氨酸	UCA 丝氨酸	UAA 终止密码	UGA 终止密码	A
	UUG 亮氨酸	UCG 丝氨酸	UAG 终止密码	UGG 色氨酸	G
C	CUU 亮氨酸	CCU 脯氨酸	CAU 组氨酸	CGU 精氨酸	U
	CUC 亮氨酸	CCC 脯氨酸	CAC 组氨酸	CGC 精氨酸	C
	CUA 亮氨酸	CCA 脯氨酸	CAA 谷氨酰胺	CGA 精氨酸	A
	CUG 亮氨酸	CCG 脯氨酸	CAG 谷氨酰胺	CGG 精氨酸	G
A	AUU 异亮氨酸	ACU 苏氨酸	AAU 天冬酰胺	AGU 丝氨酸	U
	AUC 异亮氨酸	ACC 苏氨酸	AAC 天冬酰胺	AGC 丝氨酸	C
	AUA 异亮氨酸	ACA 苏氨酸	AAA 赖氨酸	AGA 精氨酸	A
	AUG 甲硫氨酸	ACG 苏氨酸	AAG 赖氨酸	AGG 精氨酸	G
G	GUU 缬氨酸	GCU 丙氨酸	GAU 天冬氨酸	GGU 甘氨酸	U
	GUC 缬氨酸	GCC 丙氨酸	GAC 天冬氨酸	GGC 甘氨酸	C
	GUA 缬氨酸	GCA 丙氨酸	GAA 谷氨酸	GGA 甘氨酸	A
	GUG 缬氨酸	GCG 丙氨酸	GAG 谷氨酸	GGG 甘氨酸	G

所合成的蛋白质必须折叠成天然的结构,才具备生物活性。如果天然结构含有二硫键,则必须形成二硫键。而具有四级结构的蛋白质,其活性也必须依赖于不同肽链的结合。通常,蛋白质必须经过一系列的翻译后修饰才具备完整的活性。最为常见的翻译后修饰是从肽链的 N 端或者 C 端切除一个或几个氨基酸基团。氨基酸的侧链也要经过诸如磷酸化、乙酰化、甲基化等化学修饰。糖蛋白是通过糖基化来合成的,如在肽链上加一个寡糖。用类似的方法,也可以形成脂蛋白。目前已知的翻译后修饰有 150 多种。这些修饰并不能由 DNA 的序列决定,但对于蛋白质的生物学活性却是至关重要的。

1.3　糖

糖是指多羟基醛或酮,以及它们失水后结合而成的缩聚物。糖类是自然界中存在最多而又很重要的有机化合物,糖类分子的通式为 $C_m(H_2O)_n$,故糖又称为碳水化合物(carbohydrate)。有些糖并不符合这个通式,而有些符合该通式的无机物却不属于糖类。

糖具有重要而广泛的功能[6],其主要生物学作用是作为能源和碳源物质,部分糖类物质参与细胞的结构组成。糖是一切生命体维持生命活动所必需能量的主要

来源，并广泛参与物质的组成，如为蛋白质、核酸、脂类的合成提供碳骨架，是植物和细菌细胞壁的主要构成成分等。它还作为结构信号参与细胞通讯，如以细胞膜表面糖蛋白的寡糖链参与细胞间的识别等。

根据糖结构单元的数目多少可将其分成三大类：单糖、低聚糖和多糖。

1.3.1　单糖

单糖是不能水解的多羟基醛或酮，如葡萄糖、果糖等。据官能团不同，单糖可分为醛糖和酮糖；据碳原子个数不同又可分为丙糖、丁糖、戊糖、己糖和庚糖等。最简单的单糖是甘油醛（又称丙醛糖），它有两种立体异构体（图 1.34）。

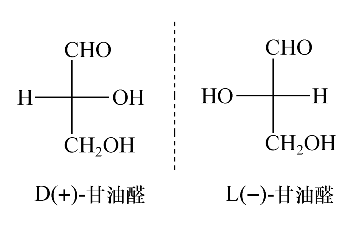


图 1.34　甘油醛的立体异构体

这两种立体异构体在旋光性上刚好相反。一种异构体使平面偏振光的偏振面沿顺时针方向偏转，称为右旋型异构体（dextro isomer）或 D 型异构体；另一种异构体则使平面偏振光的偏振面向逆时针偏转，称左旋异构体（laevo isomer）或 L 型异构体。像甘油醛这样具有旋光性差异的立体异构体又称为光学异构体（optical isomer），常用 D 和 L 表示。

以甘油醛的两种光学异构体为对照，其他单糖的光学异构体与之比较而规定为 D 型或 L 型。但 D、L 只表示构型，（＋）、（－）才表示旋光方向，两者之间没有必然的联系。

糖的链状结构一般用 Fischer 投影式表示：碳骨架竖直写；氧化程度最高的碳原子在上方。用 Fischer 投影式表示环状结构很不方便，Haworth 结构式比 Fischer 投影式更能正确反映糖分子中的键角和键长度。转化方法包括：①画一个五元或六元环；②从氧原子右侧的端基碳（anomerio carbon）开始，画上半缩醛羟基，在 Fischer 投影式中右侧的居环下，左侧居环上。Haworth 结构式虽能正确反映糖的环状结构，但还是过于简单。由于糖分子具有环状结构，所以构象式（船式和椅式）最能正确地反映糖的结构，它反映了糖环的折叠形结构。

在溶液中，糖的链状结构和环状结构之间可以相互转变，最后达到一个动态平衡，称为变旋现象（图 1.35）。从乙醇水溶液中结晶出的 D-葡萄糖称为 α-D-（＋）葡萄糖，从吡啶溶液中结晶出的 D-葡萄糖称为 β-D-（＋）葡萄糖。将 α-D-（＋）葡萄糖与 β-D-（＋）葡萄糖分别溶于水中，放置一段时间后，其旋光率都逐渐转变为＋52.7°。原因就是葡萄糖的不同结构形式相互转变，最后各种结构形式达到一定的平衡，其中，α 型占 37％，β 型占 63％，链式占 0.1％。

变旋现象是糖中普遍存在的现象。大多数单糖在水溶液中都存在这种环状结构与开链式的互变平衡。

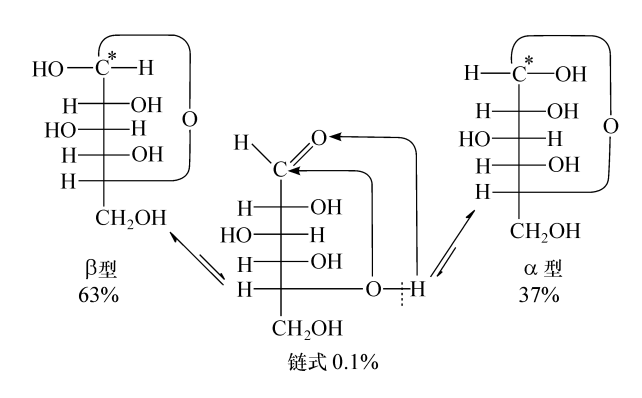


图 1.35　葡萄糖的变旋现象

1.3.2　低聚糖

低聚糖是水解后产生两个或几十个单糖分子的糖类。其中，由 2～10 个单糖分子脱水缩合而成的低聚糖又称寡糖，寡糖中以双糖最为普遍，意义也较大，如麦芽糖、蔗糖等。

根据低聚糖是否具有还原性，还可分为还原性低聚糖和非还原性低聚糖。

还原性低聚糖分子中存在苷羟基，有还原性，能成脎，有变旋现象，如麦芽糖、纤维二糖、乳糖、芸香糖等(图 1.36)。

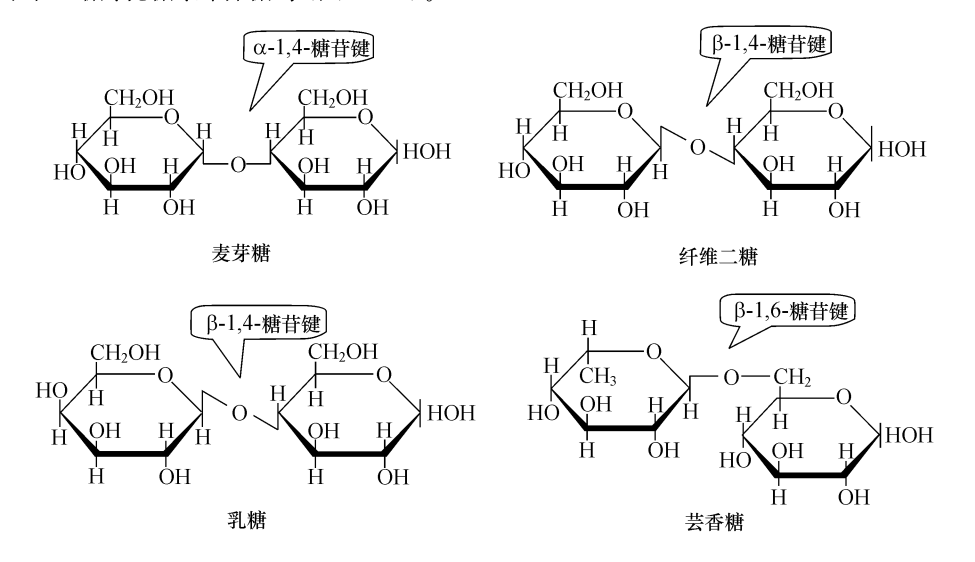


图 1.36　某些还原性低聚糖的 Haworth 式结构

非还原性低聚糖分子中不存在苷羟基，无还原性，不能成脎，没有变旋现象，如蔗糖、环糊精等(图 1.37、图 1.38)。

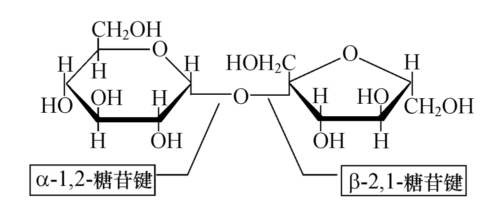


图 1.37　蔗糖的 Haworth 式结构

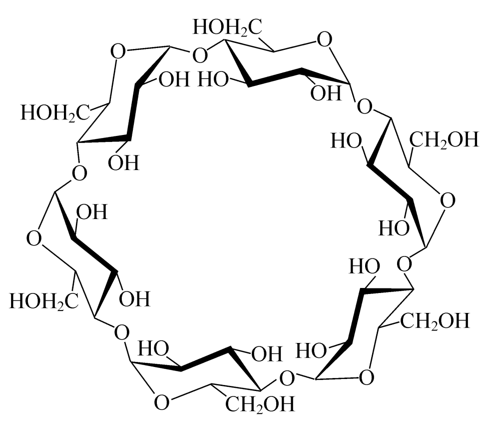


图 1.38　环六糊精的构象式结构

从结构上看，环糊精是由 6～8 个或更多个葡萄糖单元通过 α-1，4-糖苷键连接起来的环状化合物，它们分别称为环六糊精（α 环糊精）、环七糊精（β 环糊精）和环八糊精（γ 环糊精）。环糊精分子彼此叠加起来，形成二聚体或多聚体，呈圆筒形，中间有一空穴。环糊精内腔疏水，上、下两端开口处亲水的结构，使许多与环糊精空穴大小相当的非极性有机分子或有机分子的非极性一端能进入环糊精的内腔，通过分子间作用力，形成包结物，从而改变这些有机物的理化性质。所以环糊精可作为稳定剂、乳化剂、抗氧化剂，增大材料在水等极性溶剂中的溶解性等，在食品、医药、农业化工及轻工业等领域有着广泛的用途。

1.3.3　多糖

多糖是水解后能产生数十、数百乃至成千上万个单糖分子的糖类，如淀粉、纤维素等。

在生物有机体内多糖分子具有广泛的生物功能。比较常见的生物功能有：能量储存形式（淀粉是植物储存的养料，糖原是动物储存的养料）；植物、动物骨架的原料；复杂的生物功能（如细胞表面的相互作用、调节和识别等）。

组成多糖的单糖大部分是戊醛、己醛、酮糖或单糖的衍生物。多糖与单糖和低聚糖在性质上有较大的区别：多糖没有甜味，大多不溶于水，没有还原性和变旋现象。而具有复杂生物功能的则是糖复合体，如糖蛋白和糖脂。

淀粉是混合物，可分为直链淀粉和支链淀粉。直链淀粉是由 D-葡萄糖分子以 α-1，4-糖苷键结合而成的线型天然高分子化合物（一级结构），其分子链上含有 100 ～6000 个（一般为 250 ～ 300 个）葡萄糖单元。直链淀粉能溶于热水，可被淀粉酶催化水解生成麦芽糖，进而水解为葡萄糖被人体吸收。支链淀粉是高度支链

化的 D-葡萄糖聚合物，其相对分子质量大于直链淀粉，分子链上含有 1000 ～ 3 000 000个(一般都在 6000 个左右)葡萄糖单元。支链淀粉的主链也是由 D-葡萄糖分子以 α-1,4-糖苷键结合而成，但在主链上大约每隔 20～30 个葡萄糖单元就会出现支链，在支链上还会出现分支，呈树枝状分枝结构。在分支点上，两个葡萄糖单元之间以 α-1,6-糖苷键结合。

纤维素是由多个 D-葡萄糖分子以 β-1,4-糖苷键结合而成的线型天然高分子化合物，分子链上有 5000～10 000 个葡萄糖单元。在线型的纤维素分子链中，由于连接葡萄糖单元的是 β-1,4-糖苷键，所以不能形成直链淀粉的螺旋状结构，从而使纤维素分子链之间借分子间氢键构成平行的微晶束，约 30～60 个分子为一束，有规律地扭在一起，多个微晶束靠分子间氢键绞在一起又形成微纤丝(每个微纤丝含有 280～800 个纤维素分子链)，微纤丝排列起来便形成肉眼可见的纤维。这种立体的空间结构，使得纤维素具有良好的机械强度和化学稳定性。

1.4　生物分子的分析化学

生物分析化学是以分析化学的理论、方法和技术为基础，以生物化学、分子生物学、免疫学和细胞学等学科的理论与技术为补充，以数学、物理学和计算机技术为手段，测量并获取生物体系中的生物物质的组成、结构、功能和化学信息的前沿性交叉学科。它的任务主要是提供生物体系中的生物活性物质的组成、含量、结构、形态等方面的信息，发展获取这些信息的方法以及复杂生物物质的分离和纯化技术，建立用于研究生命活性物质间相互作用的技术手段。

生物分析化学是生命科学研究发展的产物，它不同于传统的有机小分子分析，对生物分子的分析不仅包括对单一物质的定性分析、定量检测、结构解析和功能研究等几方面，还包含对复杂成分，包括生物体的基本单元——细胞的组成分析、分离纯化和相互作用研究等。随着系统生物学和组学的发展，生物分析化学的研究内涵越来越丰富，研究手段越来越先进，研究技术要求越来越高，研究信息越来越广泛。由于生命过程研究需要同时获取大量各类分子相互作用的生化信息，快速、廉价、简便、直观、准确、稳定、高灵敏度、高选择性、高通量的分析方法的发展和创立越来越重要。

生物分析化学涉及生物体中的一切物质和与生命过程相关的活性分子、调控分子、信号分子、致毒元素等。在分析化学中，有许多方法可用于这些生物物质的定性、定量和结构分析。如对混合物的定性以及定量检测可以用气相色谱(GC)和液相色谱(LC)。化学传感器和生物传感器也可用来选择性地定量分析混合物中的某一成分。另外，还可以用核磁共振法(NMR)、质谱法(MS)、红外光谱法(IR)、紫外-可见分光光度法、X 射线晶体照相术等方法分析纯化的物质。

由于生物体系的特殊性和对分析方法的特殊要求，生物体内物质的组合和排

序构筑的复杂多变的特殊形态、多级结构和与结构相关的特殊功能，以及生物体内各物种的丰度千差万别，大部分分析方法不能有效地用于核酸及蛋白质的分析。气相色谱要求被分析物具有挥发性和热稳定性，而生物分子几乎不具备这些特点。MS 常用来测定分子质量，但高分子质量的生物分子经过传统的电离作用会断裂成大量的片段，难以进行分子质量的测定。NMR 法能很好地阐明中等分子质量物质的结构，但在对任何一个核酸或蛋白质分子的分析中都会产生庞大数量的信号，使得分析物质的结构几乎变得不可能。通过红外和紫外光谱法来解析物质的结构也面临相同的问题。

核酸和蛋白质都是很大的生物多聚体，有时由几千个单体连接组成，改变蛋白质中的一个氨基酸就可以改变它的折叠方式和生物活性，一个碱基的突变就可能造成遗传性疾病，因此，要求分析方法能非常准确地测定出蛋白质的氨基酸序列和核酸的碱基序列。如果对大量样品同时进行分析与比较，那么测序方法不仅要准确，还需实现大规模的自动化分析。一个细胞中的蛋白质有几千种，对蛋白质进行测序的时候也常需将它消化成较小的片段，因此，对生物分子的分离方法还必须十分有效。待分析样品通常含量很低，这就要求对生物样品进行提取和纯化，分析方法应具有很高的灵敏度。对分子质量高达几千道尔顿的生物分子的三维结构分析则要求非常尖端的分析方法。

如果没有最近几十年的生物分析方法的发展和对其的改进，也就没有如今基因组学和蛋白质组学研究的巨大成就。随着高分子质量的准确测定方法、DNA 和蛋白质测序方法和对几千种分子进行有效分离等方法的相继建立和应用，现代分析化学已经发生了重大的变革。这些方法很多已经应用到商业化的分析仪器中，这些仪器具有高通量、自动化及电脑控制分析的特点，如表 1.7 所列。

表 1.7　常见小分子分析方法与生物分析化学方法

<table>
<tr><th rowspan="2">分析内容</th><th rowspan="2">小分子分析方法</th><th colspan="2">生物分析化学方法</th></tr>
<tr><th>核酸</th><th>蛋白质</th></tr>
<tr><td rowspan="2">混合物的定性分析</td><td>气相色谱</td><td>毛细管电泳</td><td>飞行时间质谱</td></tr>
<tr><td>液相色谱</td><td colspan="2">凝胶电泳、双向电泳</td></tr>
<tr><td rowspan="4">混合物中某种物质的定量分析</td><td>气相色谱</td><td>毛细管电泳</td><td rowspan="3">生物传感器，免疫分析</td></tr>
<tr><td>液相色谱</td><td>定量 PCR</td></tr>
<tr><td>化学与生物传感器</td><td>DNA 芯片</td></tr>
<tr><td>荧光、紫外-可见光谱分析</td><td colspan="2">生物传感器</td></tr>
<tr><td rowspan="4">单一物质的定性分析</td><td>质谱</td><td>PCR</td><td>氨基酸组成分析</td></tr>
<tr><td rowspan="3">核磁共振</td><td rowspan="3">DNA 芯片</td><td>胰蛋白酶消化凝胶电泳</td></tr>
<tr><td>飞行时间质谱</td></tr>
<tr><td>电喷雾电离质谱</td></tr>
<tr><td rowspan="4">单一成分的结构分析</td><td>核磁共振</td><td>DNA 测序</td><td>氨基酸测序</td></tr>
<tr><td>质谱</td><td colspan="2">核磁共振</td></tr>
<tr><td>红外光谱</td><td colspan="2">X 射线晶体照相术</td></tr>
<tr><td>X 射线晶体照相术</td><td colspan="2">电子显微镜</td></tr>
</table>

1.4.1　核酸的分析

基因组学是指研究一个细胞或生物体的全部基因组，如整个 DNA 的序列并确定序列上的全部基因。人类基因组由 30 亿个碱基对组成，大约含有 30 000～40 000个基因。通过基因组学研究可以加深对遗传性疾病、组织产生和基因相互作用的理解。

核酸分析包括 DNA 分析和 RNA 分析，但由于 RNA 的稳定性受其存在环境的影响，对应的分析方法不多，通常要通过逆转录进行序列分析。核酸的测序分析包括分离纯化、定量检测、扩增和测序等主要步骤。

从细胞中分离 DNA 或 RNA 有许多简便的方法，如液-液提取、沉淀和离心等。核酸分离后需要进行定量检测，可以采用紫外-可见分光光度法、荧光标记法或放射标记法等。

如果知道 DNA 分子的一部分序列，可以通过聚合酶链反应（PCR）进行扩增。而实时定量 PCR 在扩增过程中可以定量检测 DNA 的含量。其他的 DNA 定量检测方法还有 DNA 芯片和生物传感器等。

DNA 的测序方法包括 Maxam-Gillbert 化学降解法、Sanger 法、DNA 芯片和焦磷酸测序法等。通常 DNA 分子在测序前需用限制性内切酶进行处理，产生的片段可以通过凝胶电泳进行分离。

1.4.2　蛋白质的分析

蛋白质组学研究的目的是通过研究一个细胞或组织或个体全部表达的蛋白质，以从整体上阐明它们与健康和疾病的相互关系。对某一蛋白质的分析包括分离和性质研究。

细胞中的蛋白质浓度通常很低，也不能像核酸的扩增反应一样对蛋白质进行扩增。在复杂的细胞基质中分离蛋白质，要求高产率且不改变其生物学功能是非常困难的。可以采用的分析方法包括液-液提取、离心和沉淀等。蛋白质或一组蛋白质可以通过液相色谱法或者聚丙烯酰胺凝胶电泳法从杂质中提取出来。

对蛋白质的定量检测可以使用定氮法、浊度法、紫外分光光度法、荧光法和免疫分析法等。肽键在波长 205 nm 处有最大吸收峰，色氨酸和酪氨酸等芳香族氨基酸在波长 280 nm 处也有强吸收峰，并可通过比色法测定。这些方法只能测定总蛋白质的浓度。如果要对某种蛋白质进行定量分析，就需要首先分离这种蛋白质或者通过抗体抗原反应的高度灵敏性和特异性，采用生物学的方法或生物传感器对靶蛋白进行定量检测。

蛋白质的氨基酸组成可以通过完全水解肽键，然后分离并定量测定所获得的氨基酸来确定。离子交换层析、反相液相色谱和毛细管电泳可以用来分离和定量。

如果是已知的蛋白质,通过氨基酸组成可对蛋白质进行鉴定。

另外,通过胰蛋白酶的部分消化,其片段分离后,可通过生物质谱技术测定其分子质量。分析方法包括高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF-MS)、电喷雾电离质谱法(ESI-MS)、液相色谱-电喷雾电离质谱法(LC-ESI-MS)或毛细管电泳-电喷雾电离质谱法(CE-ESI-MS)等。

如果上述两种方法都不能对蛋白质进行鉴定,那就有必要对蛋白质进行氨基酸测序。

蛋白质组学研究需要将细胞中的各种蛋白质全部提取出来并对其进行分离分析。凝胶电泳法,尤其是 2D-GE 能有效分离各种不同的蛋白质。

如果能获得单晶体,则可以采用最新的 NMR、电子显微镜或 X 射线晶体照相术对蛋白质和核酸的三维结构进行解析。

1.4.3 糖的分析

利用糖的理化性质对糖进行定性、定量分析并不难。如葡萄糖的测定法包括无机化学、有机化学、生物化学(酶法)和现代仪器分析技术四大类方法。其中前两类方法趋于淘汰,酶法使用最普遍,而与现代仪器分析技术(如生物传感器)相结合的测定方法在即时动态监测、减少创伤次数、方便自我监测等方面独具特色。

通过液相色谱、气相色谱可对复杂糖组分进行分离分析,生物质谱可确定糖的分子质量,并可结合其他生物分析化学技术对糖的结构和序列进行部分解析,而二维核磁共振谱(2DNMR)是获取低聚糖和多糖结构信息,尤其是在多糖序列分析方面的有力工具。

由于糖分子结构上的多样性和复杂性,使其有可能成为高密度的信息载体,因而在揭示糖所携带的复杂生物学信息方面尚需要大量的创新性和探索性工作。

参考文献

[1] 周爱儒. 生物化学. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社,2004

[2] Stryer L, Berg J M, Tymoczko J L. Biochemistry. 5th edition. W. H. Freeman and Co., 2002

[3] Nelson D L, Lehninger A L, Cox M M. Principles of biochemistry. 3rd edition. Worth Publishers, 2000

[4] Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. Molecular biology of the cell. 4th edition. Garland Science Publishing, 2002

[5] Lodish H, Berk A, Zipursky L S et al. Molecular cell biology. 4th edition. W. H. Freeman, 2000

[6] Burtis C A, Ashwood E R, Bruns D E. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th edition. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 2006

第 2 章　生物样品的制备

生物分析化学的分析对象不同于经典分析化学，分析样品主要来自于组织、细胞和体液，要获得好的分析结果，样品制备往往是一个瓶颈环节，样品处理方法是否合理是影响实验结果的关键因素之一。在以基因组学和蛋白质组学为代表的生命科学迅猛发展的今天，样品的处理和制备越来越受到人们的关注[1]。

本章所介绍的内容是有关生物样品处理的基本原则和通用的常规处理技术，并适当介绍了某些新的技术。在有关章节，还将结合各种分析对象（如氨基酸、核酸、蛋白质组、代谢物组等）介绍具体的样品处理技术。

2.1　生物分析化学分析对象的复杂性

生物分析化学的对象是生物分子。生物分子所涵盖的范围十分广泛，既包括了生物大分子，又包括了各种各样的生物小分子。

生物大分子主要是指蛋白质与多肽、核酸、多糖与寡糖以及它们以各种形式形成的复合物。生物大分子的分离纯化与制备是一件十分细致而困难的工作，制备一份符合分析要求的样品，往往需要付出长期和艰苦的努力。

生物小分子则是指生命体内除了生物大分子以外的各种具有生物学活性的小分子化合物，如各种内源性生物小分子及其代谢产物、外源性小分子（如化学药物、中药）进入体内后的原形分子及各种代谢产物等。生物小分子在体内种类繁多，性质相差很大，因此对于它们的分离与制备也是一项相当困难的工作。

生物样品往往是一种具有高度复杂性的体系，这种复杂性表现在组成、含量、动力学范围、时空依存性等各个方面，这使得生物样品的处理有很大的难度。因此，与经典分析化学的样品制备相比，生物分析化学的样品制备具有以下特点：

（1）生物样品的组成极其复杂，常常包含有数百种乃至几千种化合物。如人类血浆蛋白质组学的阶段性研究结果表明，正常人血浆中的蛋白质至 2005 年时已鉴定了 3020 种。有的生物分子在分离过程中还在不断地进行代谢，所以生物分子的分离纯化方法差别极大，想找到一种适合各种生物大分子分离制备的标准方法是很困难的。

（2）许多生物分子在生物材料中的含量极微，只有万分之一、几十万分之一，甚至几百万分之一。分离纯化的步骤繁多，流程长，有的目的产物要经过十几步、几十步的操作才能达到所需纯度的要求。

(3) 生物分子往往有很宽的动力学浓度范围。如不同的蛋白质在细胞内的浓度分布范围相差 $10^{6}\sim10^{10}$ 倍，而同一种蛋白质在不同的生理或病理状态下浓度相差也很大。

(4) 许多生物分子一旦离开了生物体内环境就极易失活，因此分离过程中如何防止其失活，就是生物分子提取制备最困难之处。过酸、过碱、高温、剧烈的搅拌、强辐射及本身的自溶等都会使生物大分子变性而失活。

(5) 生物分子的分离和制备几乎都是在溶液中进行的，很难准确估计和判断温度、pH、离子强度等各种参数对溶液中各种成分的综合影响，因而实验结果常常带有很大的经验成分，实验的重复性较差，分析仪器、分析方法、个人的实验技术水平和经验对实验结果会有较大的影响。

实际上，迄今为止的各种制备生物样品的方法都还不能完全达到生命科学研究的要求。

制备生物分子的基本原则是：以尽可能少的步骤、尽可能短的时间，获得尽可能多的目标产品。通常包括以下步骤：①确定要制备的生物分子的目的和要求；②通过文献调研和预备性实验，掌握目标产物的物理、化学以及生物学性质；③生物材料的破碎和预处理；④分离纯化方案的选择和探索；⑤选择相应、可靠的分析技术，建立鉴定生物分子制备物的均一性(即纯度)的方法；⑥产物的浓缩、干燥和保存。

在进行样品处理时，需要考虑的生物分子的物理、化学及生物学性质主要有：①在水和各种有机溶剂中的溶解性；②在不同温度、pH 的溶液和各种缓冲液中的稳定性；③固态时对温度、含水量和冻干时的稳定性；④各种物理性质，如分子的大小、穿膜的能力、带电的情况、等电点、在电场中的行为、离心沉降的表现、在各种凝胶与树脂等填料中的分配系数等；⑤其他化学性质，如对各种蛋白酶、水解酶的稳定性和对各种化学试剂的稳定性；⑥对其他生物分子的特殊亲和力；⑦在细胞内的定位等。

生物大分子和生物小分子的分离纯化方法多种多样，主要是依据它们之间在物理、化学及生物特异性方面的差异，如分子的大小、形状、酸碱性、溶解性、溶解度、极性、电荷和与其他分子的亲和性等。各种方法的基本原理大体可以归纳为两个方面：一是利用混合物中几个组分分配系数的差异，把它们分配到两个或几个相中，如盐析、有机溶剂沉淀、层析和结晶等；二是将混合物置于某一物相(大多数是液相)中，通过物理力场的作用，使各组分分配于不同的区域，从而达到分离的目的，如电泳、离心、超滤等。目前，纯化蛋白质等生物大分子的关键技术是电泳、色谱和高速与超速离心。由于生物大分子不能加热熔化和汽化，因而所能分配的物相只限于固相和液相，在此两相之间交替进行分离纯化。在实际工作中往往要综合运用多种方法，才能制备出高纯度的生物大分子。

鉴定制备产物的均一性(即纯度)，通常只采用一种方法是不够的，必须同时采

用2～3种不同的纯度鉴定法才能确定。如蛋白质和酶制成品纯度的鉴定最常用的方法是SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳，如能再用高效液相色谱(HPLC)和毛细管电泳(CE)进行联合鉴定则更为理想，必要时还要再做N端氨基酸残基的分析鉴定。

核酸的纯度鉴定通常采用琼脂糖凝胶电泳分析和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，但最方便的还是紫外吸收法，即测定样品在pH 7.0时260nm与280nm的吸光度(A_{260}和A_{280})，从A_{260}/A_{280}的比值即可判断出核酸样品的纯度。

2.2　生物材料的选择

生物材料来源于动物、植物和微生物及其代谢产物，应尽可能选择含量高、来源丰富、制备工艺简单、成本低的生物材料。但往往这几方面的要求不能同时具备，通常含量丰富但来源困难，或含量来源较理想，但材料的分离纯化方法烦琐，流程很长，反倒不如含量低些但易于获得纯品的材料。由此可见，必须根据具体情况，抓住主要矛盾进行取舍。植物材料的选材应注意季节性、地理位置和生长环境等。动物材料的选材要注意其年龄、性别、营养状况、遗传素质和生理状态等。动物在饥饿时，脂类和糖类含量相对减少，有利于生物大分子的提取分离。微生物材料的选材要注意菌种的代数和培养基成分之间的差异，例如在微生物的对数期，酶和核酸的含量较高，可获得较高的产量。

材料选定后要尽可能保持新鲜，尽快加工处理。动物组织要先除去结缔组织、脂肪等非活性部分，绞碎后在适当的溶剂中提取，如果所要求的成分在细胞内，则要先破碎细胞。植物要先去壳、除脂。微生物材料要及时将菌体与发酵液分开。生物材料如暂不提取，应冰冻保存。动物材料则需深度冷冻保存。

2.3　激光捕获显微切割技术

激光捕获显微切割技术(laser-capture microdissection，LCM)是在显微状态或显微镜直视下通过显微操作系统对欲选取的材料(组织、细胞群、细胞、细胞内组分或染色体区带等)进行切割、分离，获取均匀性很好的目标细胞(homogeneous cell)，以用于后续研究的显微分离收集技术。

2.3.1　LCM的特点

显微切割技术的特点可以概括为以下4方面[2,3,4]：

(1) LCM可以从任何组织中快速、精准地分离出纯的特异细胞及细胞群。每次黏附的直径在7.5～30μm间可调，既能分离任何形状的单细胞，又能分离大面

积组织。因此，利用显微切割技术可以分离收集到像核仁、包涵体及染色体特异区带这样细微的对象。

（2）利用显微切割技术是在组织细胞或染色体的原位取材，因此，所取材料的定位清楚，所研究对象的历史背景明确。例如，霍杰金氏淋巴瘤中，瘤组织成分多样，特征性的瘤细胞（R-S 细胞及其变异型）占细胞成分的 2%左右，且呈散在性分布。如果常规地用组织匀浆的方式从组织中提取蛋白质或核酸，则既包含了来自瘤细胞的成分，又包含了来自淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、组织细胞等多种非瘤细胞的成分，这样所提的蛋白质或核酸来自何种细胞并不清楚，而如果用显微切割技术则可以选择我们需要的细胞，以使研究对象的历史背景明确。

（3）显微切割技术可以保证所取材料在一定层次上的同质性。虽然流式细胞技术也是一种强有力的同质细胞分离技术，但是它只能处理悬浮液中的细胞，不可能用于各种处于固态的组织中的同质细胞的分离。而且，流式细胞技术需要各种特殊的标记物才能完成分离。因此，可以认为 LCM 是对流式细胞技术的一种重要的完善和补充。由于 LCM 的取材具有高度的均匀性，因此与从其他制备来源的样品细胞所得到的研究结果相比，其获取的数据更为精确和具有代表性。

（4）LCM 适用于苏木素伊红染色（Hematoxylin Eosin stain，H&E stain）、免疫组化、荧光标记等多种染色方式，可以与多种分子生物学、免疫学及病理学技术结合使用。LCM 分离的特异细胞或组织可以进行测序、聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）、定量 PCR（quantitative PCR）、生物芯片、质谱及二维凝胶电泳等分析。

因此，在蛋白质组学、基因组学以及分子生物学的研究中，LCM 日益受到重视，已成为许多深入研究工作中起始的重要一步。

2.3.2 LCM 的仪器与基本操作

目前，LCM 仪器有两种类型，一种是以 ARCTURUS 公司的产品 PixCell IIe LCM System 为代表，它是在倒置显微镜上装置了近红外固体激光器（Laser：solid-state near infrared diode），其技术参数为：激光寿命（Laser Life-time）：$>10^{10}$ 脉冲，激光能量（Laser Power）：0～100 mW，脉冲长度（Pulse Length）：0.10～1000 ms。取样时，产生直径可调（7.5～30μm）的照射点，光束固定不动，载物台移动，将激光逐点打到样品区。

如图 2.1(a)所示，进行切割的组织样品置于载玻片上，风干，以 100μm 厚的 ethylene/vinyl 乙酸纤维热敏膜覆盖于干燥的样品上。样品帽罩在所选择的切割区后，通过 ZnSe 棱镜将 CO_2 激光束聚焦在组织切片的目标点上，CO_2 脉冲激光束的波长及功率可以根据样本的情况进行调节。照射时，激光束 90%以上的能量被热敏膜吸收，产生 90℃的瞬间高温，导致膜融化，润湿靶点处的目标样品，并迅速

冷却和再结晶。由于膜与目标样品的黏着力强于目标样品与载玻片之间的黏着力，因此，如图 2.1(b)所示，激光照射区的细胞被黏着在热敏膜上，再通过机械系统转移并收集目标样品。在切割细胞的过程中，仅少量热能被膜下样品吸收，因此不会导致样品内的各种成分发生变性。

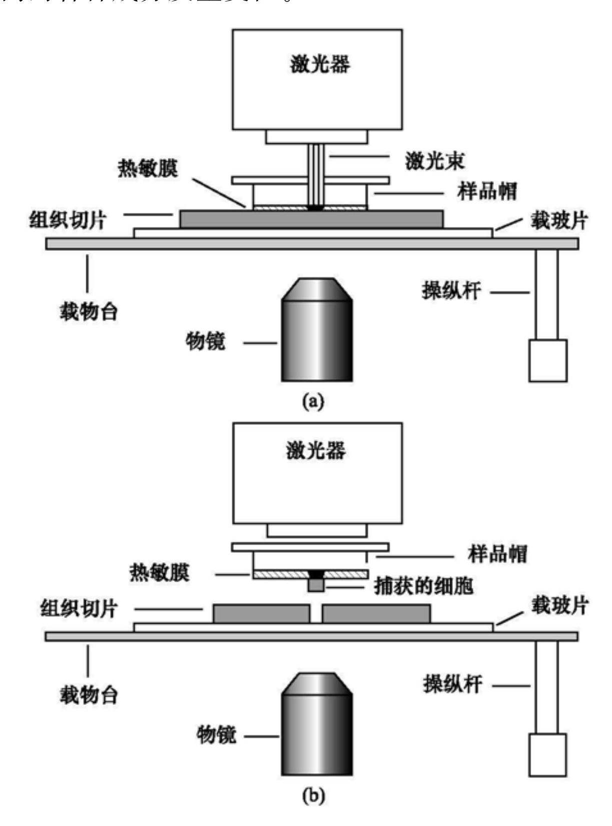


图 2.1　LCM 切割原理图

另一种是以 Leica 公司的产品 Laser Micro-Dissection(LMD)为代表，使用 LEICA DM LA 微电脑控制的研究级正置显微镜(UV-专用，具有荧光装置)，配有 UV 专用高解析物镜(10×，20×，40×，63×，100×)，克服了倒置显微镜无法使用高倍油镜的缺点。它利用聚焦的紫外激光束自动扫描切割所需样品边缘，与拟获取的样品完全无接触。载物台固定，光束自动扫描切割。采用重力自然掉下方式(gravity)取样，已完成切割的样品，完全无须借助外力，以重力自然掉下方式落至样品盖，完全避免了发热对于样品的影响。其技术参数为：UV-A Nitrogen-Laser，337 nm；300 μJ；pulse duration 3 ns；Rep. rate 30 Hz。

一般而言，每次激光照射平均捕获 3～5 个细胞，每 1000～3000 束照射收集满一个样品帽约需时 30min。切割的细胞数视实验要求而有所不同，如一次免疫杂

交实验需要 20 000～40 000 个细胞,而一次双向电泳实验则需要 250 000 个细胞。

2.3.3　LCM 的实例

激光捕获显微切割的材料可以是以各种方式贴附于固相支持物上的各种组织细胞成分,如石蜡组织切片、冰冻组织切片、细胞铺片、细胞爬片、细胞甩片、培养细胞、常规制备的染色体等。图 2.2 展示了经各种染色方法从石蜡组织切片、冰冻组织切片等样品中切割的各种细胞的实例。

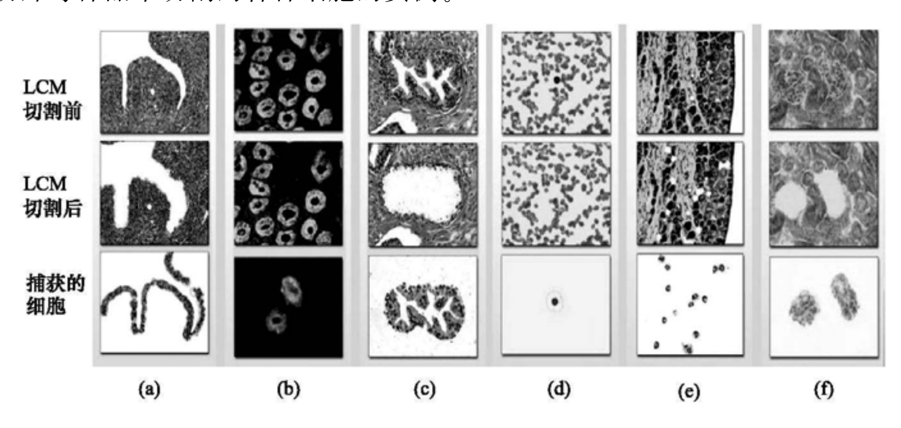


图 2.2　LCM 对各类样品的切割结果

(a) 大鼠子宫上皮 H & E 染色的冰冻切片样品;(b) 人空肠 Cy2-Ab 抗 Cytokeratin 上皮细胞冰冻切片样品;(c) 石蜡包埋 H & E 染色的前列腺样品;(d) 人血液中 Giemsa 染色的白细胞样品;(e) 大鼠小神经元细胞 Nissl 染色的样品;(f) 小鼠 HistoGene 染色的肾小球冰冻切片样品

2.4　细胞的破碎

除了某些细胞外的多肽激素和某些蛋白质与酶以外,对细胞内或多细胞生物组织中的各种生物分子的分离纯化,都需要事先将细胞和组织破碎,使其充分释放到溶液中并不丢失生物活性。不同的生物体或同一生物体不同部位的组织,其细胞破碎的难易不一,使用的方法也不相同。如动物脏器的细胞膜较脆弱,容易破碎;植物和微生物由于具有较坚固的纤维素、半纤维素组成的细胞壁,要采取专门的细胞破碎方法(表 2.1)。

表 2.1　各种细胞破碎方法的应用范围

细胞破碎方法	剧烈程度	应用对象
机械法		
研磨法	剧烈	固体组织细胞、微生物细胞
组织捣碎法(匀浆法)	剧烈	固体组织细胞、微生物细胞

续表

细胞破碎方法	剧烈程度	应用对象
物理法		
反复冻融法	温和	细菌细胞、组织培养细胞
超声波处理法	剧烈	悬浮细胞
压榨法	剧烈	微生物细胞、含有细胞壁的细胞
冷热交替法	温和	细菌细胞或病毒
化学与生物化学方法		
自溶法	温和	组织及各种细胞
溶胀法	温和	血细胞、组织培养细胞
酶解法	温和	植物细胞、细菌细胞、真菌细胞

(1) 机械法：①研磨。将剪碎的动物组织置于研钵或匀浆器中，加入少量石英砂研磨或匀浆，即可将动物细胞破碎，这种方法比较温和，适宜实验室使用。细菌和植物组织细胞的破碎也可用此法。②组织捣碎法。这是一种较剧烈的破碎细胞的方法，通常可先用家用食品加工机将组织打碎，然后再用 10 000～20 000 $r \cdot min^{-1}$ 的内刀式组织捣碎机（即高速分散器）将组织的细胞打碎，为了防止发热和升温过高，通常是转 10～20s，停 10～20s，可反复多次。

(2) 物理法：①反复冻融法。将待破碎的细胞冷至－20～－15℃，然后置于室温（或 40℃）迅速融化，如此反复冻融多次，由于细胞内形成冰粒使剩余细胞质的盐浓度增高而引起细胞溶胀破碎。②超声波处理法。借助超声波的振动力破碎细胞壁和细胞器的方法。破碎微生物细菌和酵母菌时，时间要长一些，处理的效果与样品浓度和使用频率有关。使用时要注意降温，防止过热。③压榨法。一种温和的、彻底破碎细胞的方法。在 1000×10^5～2000×10^5 Pa 的高压下使几十毫升的细胞悬液通过一个小孔突然释放至常压，细胞将彻底破碎。这是一种较理想的破碎细胞的方法，但仪器费用较高。④冷热交替法。从细菌或病毒中提取蛋白质或核酸时可用此法。在 90℃左右维持数分钟，而后立即放入冰浴中使之冷却，如此反复多次，绝大部分细胞可以被破碎。

(3) 化学与生物化学方法：①自溶法。将新鲜的生物材料存放于一定的酸碱度和适当的温度下，细胞结构在自身所具有的各种水解酶（如蛋白酶和酯酶等）的作用下发生溶解，使细胞内含物释放出来。使用时要特别小心操作，因为水解酶不仅可以使细胞壁和细胞膜破坏，同时也可能会使某些要提取的有效成分分解。②溶胀法。细胞膜为天然的半透膜，在低渗溶液和低浓度的稀盐溶液中，由于存在渗透压差，溶剂分子大量进入细胞，将细胞膜胀破释放出细胞内含物。③酶解法。利用各种水解酶，如溶菌酶、纤维素酶、蜗牛酶和酯酶等，于 37℃，pH8，处理 15min，可以专一性地将细胞壁分解，释放出细胞内含物，此法适用于多种微生物。例如从某些细菌细胞提取质粒 DNA 时，可采用溶菌酶（来自蛋清）破裂细胞壁；而

在破裂酵母细胞时，常采用蜗牛酶（来自蜗牛），将酵母细胞悬于 0.1 mmol·L^{-1} 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液（pH5.4）中，加 1%蜗牛酶，在 30℃处理 30min，即可使大部分细胞壁破裂，如同时加入 0.2%巯基乙醇效果会更好。此法可以与研磨法联合使用。④有机溶剂处理法。利用氯仿、甲苯、丙酮等脂溶性溶剂或十二烷基磺酸钠（SDS）等表面活性剂处理细胞，可将细胞膜溶解，从而使细胞破裂，此法也可以与研磨法联合使用。

2.5 生物大分子的提取

"提取"是在分离纯化之前将经过预处理或破碎的细胞置于溶剂中，使被分离的生物大分子充分地释放到溶剂中，并尽可能保持原来的天然状态且不丢失生物活性的过程。这一过程是将目的产物与细胞中其他化合物和生物大分子分离，即由固相转入液相，或从细胞内的生理状况转入外界特定的溶液中。

影响提取的因素主要有：目的产物在提取的溶剂中溶解度的大小；由固相扩散到液相的难易；溶剂的 pH 和提取时间等。一种物质在某一溶剂中溶解度的大小与该物质的分子结构及使用的溶剂的理化性质有关。一般地说，极性物质易溶于极性溶剂，非极性物质易溶于非极性溶剂；碱性物质易溶于酸性溶剂，酸性物质易溶于碱性溶剂；温度升高，溶解度加大；远离等电点的 pH，溶解度增加。提取时所选择的条件应有利于目的产物溶解度的增加并保持其生物活性。

2.5.1 水溶液提取

蛋白质和酶的提取一般以水溶液为主。稀盐溶液和缓冲液对蛋白质的稳定性好，溶解度大，是提取蛋白质和酶最常用的溶剂。

用水溶液提取生物大分子应注意的几个主要影响因素是：

（1）盐浓度（即离子强度）。离子强度对生物大分子的溶解度有极大的影响。有些物质，如 DNA-蛋白复合物，在高离子强度下溶解度增加；而另一些物质，如 RNA-蛋白复合物，在低离子强度下溶解度增加，在高离子强度下溶解度减小。绝大多数蛋白质和酶，在低离子强度的溶液中都有较大的溶解度，如在纯水中加入少量中性盐，蛋白质的溶解度比在纯水中大大增加，称为"盐溶"现象。但中性盐的浓度增加至一定时，蛋白质的溶解度又逐渐下降，直至沉淀析出，称为"盐析"现象。盐溶现象的产生主要是少量离子的活动，减少了偶极分子之间极性基团的静电吸引力，增加了溶质和溶剂分子间相互作用力的结果。所以低盐溶液常用于大多数生化物质的提取。通常使用 0.02～0.05 mol·L^{-1} 缓冲液或 0.09～0.15 mol·L^{-1} NaCl 溶液提取蛋白质和酶。不同的蛋白质极性大小不同，为了提高提取效率，有时需要降低或提高溶剂的极性。向水溶液中加入蔗糖或甘油可使其极性降低，增

加离子强度[如加入 KCl、NaCl、NH_4Cl 或 $(NH_4)_2SO_4$]可以增加溶液的极性。

(2) pH。蛋白质、酶与核酸的溶解度和稳定性与 pH 有关。过酸、过碱均应尽量避免，一般控制在 pH 6～8，提取溶剂的酸碱度应在蛋白质和酶的稳定范围内，通常选择在偏离等电点的两侧。碱性蛋白质选在偏酸一侧，酸性蛋白质选在偏碱的一侧，以增加蛋白质的溶解度，提高提取效果。例如，胰蛋白酶为碱性蛋白质，常用稀酸提取；而肌肉甘油醛-3-磷酸脱氢酶属酸性蛋白质，则常用稀碱来提取。

(3) 温度。为防止变性和降解，制备具有活性的蛋白质和酶，提取时一般在0～5℃的低温操作。但少数对温度耐受力强的蛋白质和酶，可提高温度使杂蛋白变性，有利于提取和下一步的纯化。

(4) 防止蛋白酶或核酸酶的降解作用。在提取蛋白质、酶和核酸时，常常受到自身存在的蛋白酶或核酸酶的降解作用而导致实验的失败。为防止这一现象的发生，常常采用加入抑制剂或调节提取液的 pH、离子强度或极性等方法使这些水解酶失去活性，防止它们对欲提纯的蛋白质、酶及核酸降解。例如，在提取 DNA 时加入 EDTA 络合 DNAase 活化所必需的 Mg^{2+}。

(5) 搅拌与氧化。搅拌能促使被提取物的溶解，一般采用温和搅拌为宜，因为速度太快容易产生大量泡沫，增大了与空气的接触面，会引起酶等物质变性失活。因为一般蛋白质都含有相当数量的巯基，有些巯基常常是活性部位的必需基团，若提取液中有氧化剂或与空气中的氧气接触过多都会使巯基氧化为分子内或分子间的二硫键，导致酶活性的丧失。在提取液中应加入少量巯基乙醇或半胱氨酸以防止巯基氧化。

2.5.2　有机溶剂提取

一些和脂类结合比较牢固或分子中非极性侧链较多的蛋白质和酶难溶于水、稀盐、稀酸或稀碱中，常用不同比例的有机溶剂提取。常用的有机溶剂有乙醇、丙酮、异丙醇、正丁酮等，这些溶剂可以与水互溶或部分互溶，同时具有亲水性和亲脂性。其中正丁醇在 0℃时在水中的溶解度为 10.5%，40℃时为 6.6%，同时又具有较强的亲脂性，因此，常用来提取与脂结合较牢或含非极性侧链较多的蛋白质、酶和脂类。例如，植物种子中的玉蜀黍蛋白、麸蛋白，常用 70%～80%的乙醇提取，动物组织中一些线粒体及微粒上的酶常用正丁醇提取。

有些蛋白质和酶既能溶于稀酸、稀碱，又能溶于含有一定比例的有机溶剂的水溶液中，在这种情况下，采用稀的有机溶液提取常常可以防止水解酶的破坏，并兼有去除杂质、提高纯化效果的作用。例如，胰岛素可溶于稀酸、稀碱和稀醇溶液，但在组织中与其共存的糜蛋白酶对胰岛素有极高的水解活性，因而采用 6.8%乙醇溶液并用草酸调溶液的 pH 为 2.5～3.0，进行提取，这样就从下面 3 个方面抑制了糜蛋白酶的水解活性：①6.8%的乙醇可以使糜蛋白酶暂时失活；②草酸可以除去

激活糜蛋白酶的 Ca^{2+}；③选用 pH2.5～3.0，是糜蛋白酶不宜作用的 pH。以上条件对胰岛素的溶解和稳定性都没有影响，却可除去一部分在稀醇与稀酸中不溶解的杂蛋白。

2.6 生物大分子的分离与纯化

由于生物体的组成成分是如此复杂，数千种乃至上万种生物分子又处于同一体系中，因此不可能有一个适合于各类分子的固定的分离程序，但多数分离工作关键部分的基本手段是相同的。常用的分离纯化方法和技术有：离心法、沉淀法（包括盐析、有机溶剂沉淀、选择性沉淀等）、色谱法、等电聚焦制备电泳法等。本节以介绍离心法和沉淀法为主。

2.6.1 离心技术

离心技术（centrifuge technique）是根据颗粒在作匀速圆周运动时受到一个外向的离心力的行为而发展起来的一种分离技术。这项技术的应用范围很广，诸如分离出化学反应后的沉淀物和天然的生物大分子、无机物、有机物，在生物化学以及其他的生物学领域常用来收集细胞、细胞器及生物大分子物质。离心技术具有比较温和、分离样品量大等特点，在生物学、医学、制药工业等方面是常用的技术之一。随着科学技术的发展，许多新材料新技术的不断推出，离心机制造业有了很大的发展。尤其是软件操作系统的发展，使离心机的操作性能有了很大的改变，结构更趋于安全合理。

1. 离心力与相对离心力

离心作用是根据在一定角速度下作圆周运动的任何物体都受到一个向外的离心力进行的。离心力（centrifugal force，F_c）等于离心加速度 $\omega^2 X$ 与颗粒质量 m 的乘积，即：$F_c = m\omega^2 X$，式中，ω 是旋转角速度，以 $rad \cdot s^{-1}$ 为单位；X 是颗粒离开旋转中心的距离，以 cm 为单位；m 是颗粒质量，以 g 为单位。

由于各种离心机转子的半径或者离心管至旋转轴中心的距离不同，离心力因而会发生变化，因此，在文献中常用相对离心力（relative centrifugal force，RCF）或“数字×g”表示离心力，只要 RCF 值不变，一个样品可以在不同的离心机上获得相同的结果。RCF 就是实际离心场转化为重力加速度的倍数。

$$\mathrm{RCF} = F_{离心力}/F_{重力} = m\omega^2 X/mg = \omega^2 X/g = 1.118\times10^{-5}\cdot n\cdot X$$

式中，X 为离心转子的半径距离，以 cm 为单位；g 为地球重力加速度（$980cm \cdot s^{-2}$）；n 为转子每分钟的转数（$r \cdot min^{-1}$）。

一般情况下，低速离心转速以 $r \cdot min^{-1}$ 表示，高速离心转速以重力加速度 g

表示。在计算颗粒的相对离心力时，应注意离心管与中心轴之间的距离，即离心半径 r(cm)的长度，离心管所处的位置不同，沉降颗粒所承受的离心力也不同。因此，超速离心常用重力加速度的倍数($\times g$)代替转速($r \cdot min^{-1}$)，这样可以真正反映颗粒在离心管中所受到的离心力。离心力的数据通常是指相对离心力的平均值，也就是指离心管中点的离心力。为了便于相对离心力和转速之间的换算，人们对半径、相对离心力和转速三者之间进行换算，设计了相对离心力的转换列线图。

2. 沉降系数、沉降速度与 *K* 系数

1) 沉降系数

颗粒在单位离心力作用下的沉降速度称该颗粒的沉降系数(sedimentation coefficient，s)。以 10^{-13} s 作为一个单位，称为斯维得贝格单位(Svedberg unit)，或称沉降系数单位，用 s 表示。

沉降系数是生物大分子的特征常数，它除了与颗粒的密度、形状和大小有关以外，还与介质的密度、黏度有关，因此，它与温度及浓度有着密切的依赖关系。同一样品在不同的温度、浓度和介质中，所测得的 s 值是不同的。为了便于比较在不同条件下所测得的沉降系数，通常规定温度为 20℃，以水为介质的条件下，测得的 s 值为标准状态 s 值。非标准状态的 s 值，可以通过其他公式校正。对于生物材料而言，绝大多数样品是以水为介质的。

2) 沉降速度

沉降速度(sedimentation velocity)是指在强大离心力作用下，单位时间内物质运动的距离。粒子的沉降速度与粒子直径的平方、粒子的密度和介质密度之差成正比；离心力场增大，粒子的沉降速度也增加。

3) *K* 系数

K 系数(*K* factor)是用来描述在一个转子中，将粒子沉降下来的效率。也就是溶液恢复成澄清程度的一个指数，所以也叫“cleaning factor”。原则上，*K* 系数愈小，愈容易、愈快将粒子沉降。

K 系数与离心转速及粒子沉降的路径有关，所以 *K* 系数是一个变数。当转速或者离心管的溶液量不同，即粒子沉降的路径改变时，*K* 系数就改变了。通常，离心机的转子说明书中提供的 *K* 系数，都是根据最大路径及在最大转速下所计算出来的数值。如果已知粒子是沉降系数为 80s 的多核糖体(polysome)，采用的转子的 *K* 系数是 323，那么预计粒子沉降到管底所需的离心时间是 $t=k/s=4$h，利用此公式预估的离心时间，对水平式转子最适合；对固定角式转子而言，实际时间将比

预估的时间短些。

3. 离心技术的分类

按照实际工作的需要，目前已设计出许多离心方法，综合起来大致可分3类：①平衡离心法。根据粒子大小、形状的不同进行分离，包括差速离心法（differential velocity centrifugation）和速率区带离心法（rate zonal centrifugation）。②等密度离心法（isopycnic centrifugation），又称等比重离心法，依粒子密度差进行分离。等密度离心法和上述速率区带离心法又合称为密度梯度离心法。③经典式沉降平衡离心法。用于对生物大分子相对分子质量的测定、纯度估计、构象变化研究等。

1）差速离心法

它利用不同的粒子在离心力场中沉降的差别，在同一离心条件下，沉降速度不同，通过不断增加相对离心力，使一个非均匀混合液内的大小、形状不同的粒子分步沉淀。操作过程中一般是在离心后用倾倒的办法把上清液与沉淀分开，然后将上清液加高转速离心，分离出第二部分沉淀，如此往复加高转速，逐级分离出所需要的物质。差速离心的分辨率不高，沉淀系数在同一个数量级内的各种粒子不容易分开，常用于其他分离手段之前的粗制品提取。

2）速率区带离心法

这种方法是根据分离的粒子在梯度液中沉降系数 s 的不同，使具有不同沉降速度的粒子处于不同的密度梯度层内分成一系列区带，达到彼此分离的目的。在离心前，于离心管内先装入密度梯度介质（如蔗糖、甘油、KBr、CsCl等），待分离的样品铺在梯度液的顶部、离心管底部或梯度层中间，同梯度液一起离心。离心后在近旋转轴处（X_1）的介质密度最小，离旋转轴最远处（X_2）介质的密度最大，但最大介质密度必须小于样品中粒子的最小密度，即 $\rho_p > \rho_m$。梯度液在离心过程中以及离心完毕后，起着支持介质和稳定剂的作用，取样时避免因机械振动而引起已分层的粒子再混合。

由于 $\rho_p > \rho_m$，可知 $s>0$，因此，该离心法的离心时间要严格控制，既要有足够的时间使各种粒子在介质梯度中形成区带，又要控制在任一粒子达到沉淀前结束离心。如果离心时间过长，所有的样品可能全部到达离心管底部；离心时间不足，样品还没有完全分离。由于此法是一种不完全的沉降，沉降受物质本身大小的影响较大，一般是应用在物质大小相异而密度相同的情况。常用的梯度液有聚蔗糖（polysucrose，商品名为Ficoll）、聚乙烯吡咯烷酮（polyvinylpyrrolidon，PVP）包裹的胶体硅（商品名为Percoll）及蔗糖。

3）等密度离心法

这种方法是根据颗粒密度的不同来进行分离的。在离心前，要预先配制介质的密度梯度液，此种密度梯度液包含了被分离样品中所有粒子的密度，待分离的样品铺在梯度液顶上和梯度液先混合，离心开始后，梯度液由于离心力的作用逐渐形成管底浓而管顶稀的密度梯度，与此同时，原来分布均匀的粒子也发生重新分布。当管底介质的密度大于粒子的密度，即 $\rho_m > \rho_p$ 时，粒子上浮；在管顶处 $\rho_p > \rho_m$ 时，则粒子沉降。最后粒子进入到一个它本身的密度位置即 $\rho_p = \rho_m$，此时 dx/dt 为零，粒子不再移动，粒子形成纯组分的区带。区带与样品粒子的密度有关，而与粒子的大小和其他参数无关，因此只要转速、温度不变，则延长离心时间也不能改变这些粒子的成带位置。

4. 梯度溶液的制备

1）梯度材料的选择原则

作为一种理想的梯度材料应具备以下几个特点：①与需要被分离的生物材料不发生反应，即完全惰性，且易与所分离的生物粒子分开；②可达到要求的密度范围，且在所要求的密度范围内，黏度低，渗透压低，离子强度和 pH 变化较小；③不会对离心设备发生腐蚀作用；④容易纯化，价格便宜或容易回收；⑤浓度便于测定，如具有折光率等；⑥对于超速离心分析工作来说，物理性质、热力学性质应该是已知的。这些条件只是理想条件，完全符合每种性能的梯度材料几乎是没有的。

几种基本上符合上述原则的梯度材料是：①糖类：蔗糖、甘油、聚蔗糖（Ficoll）、右旋糖酐、糖原；②无机盐类：CsCl、RbCl、NaCl、KBr 等；③有机碘化物：三碘苯甲酰葡萄糖胺（matrizamide）等；④硅溶胶：如 Percoll；⑤蛋白质：如牛血清白蛋白；⑥重水；⑦非水溶性有机物：如氟代碳等。

2）梯度材料的应用范围

常用梯度材料的应用范围如表 2.2 所示。

表 2.2　梯度材料的应用[7]

介质	DNA	RNA	核蛋白	膜	细胞器	细胞	病毒
蔗糖	－	－	＋	＋＋	＋＋	＋	＋＋
聚蔗糖	－	－	－	＋	＋	＋＋＋	＋＋
氯化铯	＋＋＋	＋＋	＋	－	－	－	＋＋
Percoll	－	－	－	＋	＋＋	＋＋	＋
碘化物	＋	＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋	＋＋

注：＋＋＋，很好；＋＋，好；＋，可以；－，不适用。

① 蔗糖：水溶性大，性质稳定，渗透压较高，其最高密度可达 1.33g · ml^{-1}，且由于价格低、容易制备，是现在实验室里常用于细胞器、病毒分离的梯度材料。但由于有较大的渗透压，不宜用于细胞的分离。

② 聚蔗糖：商品名为 Ficoll，常采用 Ficoll-400，相对分子质量为 400 000。Ficoll渗透压低，但黏度却特别高，为此常与泛影葡胺混合使用以降低黏度。主要用于分离各种细胞，包括血细胞、成纤维细胞、肿瘤细胞、鼠肝细胞等。

③ 氯化铯：是一种离子性介质，水溶性大，最高密度可达 1.91 g · ml^{-1}。由于它是重金属盐类，在离心时形成的梯度有较好的分辨率，被广泛地用于 DNA、RNA、质粒、病毒和脂蛋白的分离，但价格较贵。

④ Percoll：Percoll 是商品名，它是以聚乙烯吡咯酮（PVP）包裹的胶体硅，渗透压很低，对生物材料的影响小，在冷却和冻融情况下颗粒稳定，但在酸性和高离子强度的条件下不稳定。其黏度高，可用于细胞、细胞器和病毒的分离。

⑤ 卤化盐类：KBr 和 NaCl 可用于脂蛋白分离，KI 和 NaI 可用于 RNA 分离，其分辨率高于铯盐。NaCl 梯度也可用于分离脂蛋白，NaI 梯度还可分离天然或变性的 DNA。

2.6.2 沉淀法

沉淀是溶质从溶液中析出的过程。沉淀法操作简便、成本低廉，是分离纯化生物大分子，特别是制备蛋白质和酶时最常用的方法。此方法的基本原理是根据不同物质在溶剂中的溶解度不同而使它们达到分离，不同溶解度的产生是由于溶质分子之间及溶质与溶剂分子之间亲和力的差异而引起的。溶解度的大小与溶质和溶剂的化学性质及结构有关，溶剂组分的改变或加入某些沉淀剂以及改变溶液的 pH、离子强度和极性都会使溶质的溶解度产生明显的改变。通过沉淀，将目的生物大分子转入固相沉淀或留在液相，而与杂质得到初步的分离。

在生物大分子制备中最常用的几种沉淀方法是：①中性盐沉淀（盐析法）：多用于各种蛋白质和酶的分离纯化；②有机溶剂沉淀：多用于蛋白质和酶、多糖、核酸以及生物小分子的分离纯化；③选择性沉淀（热变性沉淀和酸碱变性沉淀）：多用于除去某些不耐热的和在一定 pH 下易变性的杂蛋白；④等电点沉淀：用于氨基酸、蛋白质及其他两性物质的沉淀，但此法单独应用较少，多与其他方法结合使用；⑤有机聚合物沉淀：是发展较快的一种新方法，主要使用聚乙二醇（polyethyene glycol，PEG）作为沉淀剂。

1. 中性盐沉淀（盐析法）

在溶液中加入中性盐使生物大分子沉淀析出的过程称为“盐析”。除了蛋白质和酶以外，多肽、多糖和核酸等都可以用盐析法进行沉淀分离。20%～40%饱和度

的硫酸铵可以使许多病毒沉淀；43%饱和度的硫酸铵可以使DNA和rRNA沉淀，而tRNA则保留在上清液中。盐析法应用最广的还是在蛋白质领域，已有80多年的历史。其突出的优点是：①成本低，不需要特别昂贵的设备；②操作简单、安全；③对许多生物活性物质具有稳定作用。由于酶和各种蛋白质通常是在低温下较稳定，因而盐析操作也要求在低温下(0～4℃)进行。

1）中性盐的选择

常用的中性盐中，最重要的是硫酸铵。其突出的优点是溶解度大，即使是在低温条件下，仍有相当高的溶解度，这是其他盐类所不具备的。

2）盐析的操作方法

最常用的是固体硫酸铵加入法。欲从较大体积的粗提取液中沉淀蛋白质时，往往使用固体硫酸铵。加入之前要先将其研成细粉，不能有块，要在搅拌下缓慢、均匀、少量多次地加入，尤其到接近计划饱和度时，加盐的速度更要慢一些，尽量避免局部硫酸铵浓度过大而造成不应有的蛋白质沉淀。盐析后要在冰浴中放置一段时间，待沉淀完全后再离心或过滤。在低浓度硫酸铵中盐析可采用离心分离，高浓度硫酸铵常用过滤分离，因为高浓度硫酸铵密度太大，要使蛋白质完全沉降下来需要较高的离心速度和较长的离心时间。硫酸铵浓度的表示方法是以饱和溶液的百分数表示，称为百分饱和度，而不用实际的克数或物质的量，这是由于固体硫酸铵加到水溶液中去时，会出现相当大的非线性体积变化，计算浓度相当麻烦。为了克服这一困难，有人经过精心测量，确定出1L纯水提高到不同浓度所需加入的硫酸铵的量，使用时十分方便。

3）盐析的影响因素

①蛋白质的浓度。中性盐沉淀蛋白质时，溶液中蛋白质的实际浓度对分离效果有较大的影响。通常高浓度的蛋白质用稍低的硫酸铵饱和度即可将其沉淀下来。但若蛋白质浓度过高，则易产生各种蛋白质的共沉淀作用，除杂蛋白的效果会明显下降。对低浓度的蛋白质，要使用更大的硫酸铵饱和度，其共沉淀作用小，分离纯化效果较好，但回收率会降低。通常认为比较适中的蛋白质浓度是2.5%～3.0%，相当于25～30 $mg \cdot ml^{-1}$。②pH。蛋白质所带净电荷越多，它的溶解度就越大。改变pH可改变蛋白质的带电性质，因而就改变了蛋白质的溶解度。远离等电点处溶解度大，在等电点处溶解度小，因此，用中性盐沉淀蛋白质时，pH常选在该蛋白质的等电点附近。③温度。对于多数无机盐和小分子有机物，温度升高则溶解度加大；但对于蛋白质、酶和多肽等生物大分子，在高离子强度溶液中，温度升高，它们的溶解度反而减小。在低离子强度溶液或纯水中蛋白质的溶解度大多

数还是随浓度升高而增加的。在一般情况下，对蛋白质盐析的温度要求并不严格，可在室温下进行。但对于某些对温度敏感的酶，要求在 0～4℃下操作，以避免活力丧失。

2. 有机溶剂沉淀法

1）基本原理

有机溶剂可以使许多蛋白质（酶）、核酸、多糖和小分子生化物质发生沉淀作用，其作用的原理主要是降低水溶液的介电常数。溶剂的极性与其介电常数密切相关，极性越大，介电常数越大。如 20℃时水的介电常数为 80，而乙醇和丙酮的介电常数分别是 24 和 21.4，因而向溶液中加入有机溶剂能降低溶液的介电常数，减小溶剂的极性，从而削弱了溶剂分子与蛋白质分子间的相互作用力，增加了蛋白质分子间的相互作用，导致蛋白质因溶解度降低而沉淀。另一方面，由于使用的有机溶剂与水互溶，它们在溶解于水的同时从蛋白质分子周围的水化层中夺走了水分子，破坏了蛋白质分子的水膜，因而发生沉淀作用。

有机溶剂沉淀法的优点是：①分辨能力比盐析法高，即一种蛋白质或其他溶质只在一个比较窄的有机溶剂浓度范围内沉淀；②沉淀不用脱盐，过滤比较容易（如有必要，可用透析袋脱有机溶剂）。其缺点是容易使某些具有生物活性的大分子变性失活，操作需在低温下进行。

2）有机溶剂的选择和浓度的计算

有机溶剂的选择首先是要能与水互溶。沉淀蛋白质和酶常用的是乙醇、甲醇和丙酮。沉淀核酸、糖、氨基酸和核苷酸最常用的沉淀剂是乙醇。进行沉淀操作时，欲使溶液达到一定的有机溶剂浓度，需要加入的有机溶剂的浓度和体积可按下式计算：

$$V = V_0 (S_2 - S_1) / (100 - S_2)$$

式中，V 为需加入 100%浓度有机溶剂的体积；V_0 为原溶液体积；S_1 为原溶液中有机溶剂的浓度；S_2 为所要求达到的有机溶剂的浓度；100 是指加入的有机溶剂浓度为 100%，如所加入的有机溶剂的浓度为 95%，上式的$(100 - S_2)$项应改为$(95 - S_2)$。

上式的计算由于未考虑混溶后体积的变化和溶剂的挥发情况，实际上存在一定的误差。有时为了获得沉淀而不着重于进行分离，可用原溶液体积的倍数，如加入一倍、二倍、三倍原溶液体积的有机溶剂，来进行有机溶剂沉淀。

3）有机溶剂沉淀的影响因素

① 温度：多数蛋白质在有机溶剂与水的混合液中，溶解度随温度的降低而下

降。值得注意的是大多数生物大分子(如蛋白质、酶和核酸)在有机溶剂中对温度特别敏感,温度稍高就会引起变性,且有机溶剂与水混合时产生放热反应,因此,有机溶剂必须预先冷至较低温度,操作要在冰盐浴中进行,加入有机溶剂时必须缓慢且不断搅拌以免局部过浓。一般规律是温度越低,得到的蛋白质活性越高。

② 样品浓度:样品浓度对有机溶剂沉淀生物大分子的影响与盐析的情况相似,即低浓度样品要使用比例更大的有机溶剂进行沉淀,且样品的回收率低,具有生物活性的样品易产生稀释变性。但对于低浓度的样品,杂蛋白与样品共沉淀的作用小,有利于提高分离效果。反之,对于高浓度的样品,可以节省有机溶剂,减少变性的危险,但杂蛋白的共沉淀作用大,分离效果下降。通常,使用 $5\sim20\ \mathrm{mg\cdot ml^{-1}}$ 的蛋白质初浓度为宜,可以得到较好的沉淀分离效果。

③ pH:有机溶剂沉淀适宜的 pH,要选择在样品稳定的 pH 范围内,而且尽可能选择样品溶解度最低时的 pH,通常是选在等电点附近,从而提高此沉淀法的分辨能力。

④ 离子强度:离子强度是影响有机溶剂沉淀生物大分子的重要因素。以蛋白质为例,盐浓度太大或太小都有不利影响,通常溶液中盐浓度以不超过 5% 为宜,使用乙醇的量也以不超过原蛋白质水溶液的 2 倍体积为宜。少量的中性盐对蛋白质变性有良好的保护作用,但盐浓度过高会增加蛋白质在水中的溶解度,降低了有机溶剂沉淀蛋白质的效果,通常是在低盐或低浓度缓冲液中沉淀蛋白质。

有机溶剂沉淀法经常用于蛋白质、酶、多糖和核酸等生物大分子的沉淀分离,使用时先要选择合适的有机溶剂,然后注意调整样品的浓度、温度、pH 和离子强度,使之达到最佳的分离效果。沉淀所得的固体样品,如果不是立即溶解进行下一步的分离,则应尽可能抽干沉淀,减少其中有机溶剂的含量,如若必要可以用透析袋透析脱有机溶剂,以免影响样品的生物活性。

3. 选择性变性沉淀法

这一方法是利用蛋白质、酶与核酸等生物大分子与非目的生物大分子在物理、化学性质等方面的差异,选择一定的条件使杂蛋白等非目的物变性沉淀而得到分离提纯,称为选择性变性沉淀法。常用的有热变性、选择性酸碱变性和有机溶剂变性等。

1) 热变性

利用生物大分子对热的稳定性不同,加热升高温度使某些非目的生物大分子变性沉淀而保留目的物在溶液中。此方法最为简便,不需消耗任何试剂,但分离效率较低,通常用于生物大分子的初期分离纯化。

2) 表面活性剂和有机溶剂变性

不同蛋白质和酶对于表面活性剂和有机溶剂的敏感性不同，在分离纯化过程中使用它们可以使那些敏感性强的杂蛋白变性沉淀，而目的物仍留在溶液中。使用此法时通常都在冰浴或冷室中进行，以保护目的物的生物活性。

3)选择性酸碱变性

利用蛋白质和酶等对于溶液中不同 pH 的稳定性不同而使杂蛋白变性沉淀，这通常是在分离纯化流程中附带进行的一个分离纯化步骤。

4. 等电点沉淀法

等电点沉淀法是利用具有不同等电点的两性电解质在达到电中性时溶解度最低，易发生沉淀的性质，从而实现分离的方法。氨基酸、蛋白质、酶和核酸都是两性电解质，可以利用此法进行初步的沉淀分离。但是，由于许多蛋白质的等电点十分接近，而且带有水膜的蛋白质等生物大分子仍有一定的溶解度，不能完全沉淀析出，因此，单独使用此法分辨率较低，效果不理想，因而常与盐析法、有机溶剂沉淀法或其他沉淀剂一起配合使用，以提高沉淀能力和分离效果。此法主要用于在分离纯化流程中去除杂蛋白，而不用于沉淀目的物。

5. 有机聚合物沉淀法

有机聚合物最早应用于提纯免疫球蛋白及沉淀一些细菌和病毒。近年来广泛用于核酸和酶的纯化。其中应用最多的是聚乙二醇[$HOCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OH$ ($n>4$)]，它的亲水性强，溶于水和许多有机溶剂，对热稳定。在生物大分子制备中，用得较多的是相对分子质量为 6000～20 000 的 PEG。

PEG 的沉淀效果主要与其本身的浓度和分子质量有关，同时还受离子强度、溶液 pH 和温度等因素的影响。在一定的 pH 下，盐浓度越高，所需 PEG 的浓度越低；溶液 pH 越接近目的物的等电点，沉淀所需 PEG 的浓度越低。在一定范围内，高分子质量和浓度高的 PEG 沉淀的效率高。对于聚乙二醇沉淀作用的解释主要有：①聚合物与生物大分子发生共沉淀作用；②由于聚合物有较强的亲水性，使生物大分子脱水而发生沉淀；③聚合物与生物大分子之间以氢键相互作用形成复合物，在重力作用下形成沉淀析出；④通过空间位置排斥，使液体中生物大分子被迫挤聚在一起而发生沉淀。

本方法的优点是：①操作条件温和，不易引起生物大分子变性；②沉淀效能高，使用很少量的 PEG 即可以沉淀相当多的生物大分子；③沉淀后有机聚合物容易去除。

2.6.3 透析

自 Graham 1861 年发明透析方法至今已有一百多年,透析已成为生物化学实验室最简便最常用的分离纯化技术之一。在生物大分子的制备过程中,除盐、除少量有机溶剂、除生物小分子杂质和浓缩样品等都要用到透析的技术。

透析只需要使用专用的半透膜即可完成。通常是将半透膜制成袋状,将生物大分子样品溶液置入袋内,将此透析袋浸入水或缓冲液中,样品溶液中的大分子质量的生物大分子被截留在袋内,而盐和小分子物质不断扩散透析到袋外,直到袋内外两边的浓度达到平衡为止。保留在透析袋内未透析出的样品溶液称为"保留液",袋(膜)外的溶液称为"渗出液"或"透析液"。

透析的动力是扩散压,扩散压是由横跨膜两边的浓度梯度形成的。透析的速度反比于膜的厚度,正比于欲透析的小分子溶质在膜内外两边的浓度梯度,还正比于膜的面积和温度。通常是 4℃透析,升高温度可加快透析速度。

透析膜可用动物膜和玻璃纸等,但用得最多的还是用纤维素制成的透析膜,目前常用的是美国联合碳化物公司(Union Carbide)和美国光谱医学公司生产的各种尺寸的透析管。截留分子质量(molecular weight cut off,MWCO),即留在透析袋内的生物大分子的最小分子质量,通常为 10 000 左右。

商品透析袋制成管状,其扁平宽度为 23～50 mm 不等。为防干裂,出厂时都用 10%的甘油进行处理,并含有极微量的硫化物、重金属和一些具有紫外吸收的杂质,它们对蛋白质和其他生物活性物质有害,用前必须除去。可先用 50%乙醇煮沸 1h,再依次用 50%乙醇、0.01 $mol \cdot L^{-1}$ 碳酸氢钠和 0.001 $mol \cdot L^{-1}$ EDTA 溶液洗涤,最后用蒸馏水冲洗干净即可使用。实验证明,50%乙醇处理对除去具有紫外吸收的杂质特别有效。使用后的透析袋洗净后可存于 4℃蒸馏水中,若长时间不用,可加少量叠氮化钠(NaN_3),以防长菌。洗净晾干的透析袋弯折时易裂口,用时必须仔细检查,不漏时方可重复使用。

新透析袋如不作如上的特殊处理,则可用沸水煮 5～10min,再用蒸馏水洗净,即可使用。使用时,一端用橡皮筋或线绳扎紧,也可以使用特制的透析袋夹夹紧,由另一端灌满水,用手指稍加压,检查不漏,方可装入待透析液。通常要留 1/3～1/2 的空间,以防透析过程中透析的小分子量较大时,袋外的水和缓冲液过量进入袋内将袋胀破。含盐量很高的蛋白质溶液透析过夜时,体积增加 50%是正常的。为了加快透析速度,除多次更换透析液外,还可使用磁子搅拌。透析的容器要大一些,可以使用大烧杯、大量筒和塑料桶。少量溶液的透析,可在袋内放一截两头烧圆的玻璃棒或两端封口的玻璃管,以使透析袋沉入液面以下。

检查透析效果的方法是:用 1% $BaCl_2$ 检查 $(NH_4)_2SO_4$,用 1% $AgNO_3$ 检查 NaCl、KCl 等。

为了提高透析效率,还可以使用各种透析装置。使用者也可以自行设计与制作各种简易的透析装置。美国生物医学公司(Biomed Instruments Inc.)生产的各种型号的 Zeineh 透析器,由于使用对流透析的原理,使透析速度和效率大大提高。

2.6.4 超滤

超滤现已成为一种重要的生化实验技术,广泛用于含有各种小分子溶质的各种生物大分子(如蛋白质、酶、核酸等)的浓缩、分离和纯化。超滤是一种加压膜分离技术,即在一定的压力下,使小分子溶质和溶剂穿过一定孔径的特制的薄膜,并使大分子溶质不能透过,留在膜的一边,从而使大分子物质得到了部分的纯化。

根据所加的操作压力和所用膜的平均孔径的不同,超滤可分为微孔过滤、超滤和反渗透 3 种。微孔过滤所用的操作压通常小于 4×10^4 Pa,膜的平均孔径为 500Å～14μm,用于分离较大的微粒、细菌和污染物等。超滤所用操作压为 $4\times10^4\sim7\times10^5$ Pa,膜的平均孔径为 10～100Å,用于分离大分子溶质。反渗透所用的操作压比超滤更大,常达到 $35\times10^5\sim140\times10^5$ Pa,膜的平均孔径最小,一般为 10Å 以下,用于分离小分子溶质,如海水脱盐、制超纯水等。

超滤技术的优点是操作简便,成本低廉,不需添加任何化学试剂。尤其是超滤技术的实验条件温和,与蒸发、冰冻干燥相比没有相的变化,而且不引起温度、pH 的变化,因而可以防止生物大分子的变性、失活和自溶。在生物大分子的制备技术中,超滤主要用于生物大分子的脱盐、脱水和浓缩等。超滤法也有一定的局限性,它不能直接得到干粉制剂。对于蛋白质溶液,一般只能得到 10%～50%的浓度。

超滤技术的关键是膜。膜有各种不同的类型和规格,可根据工作的需要来选用。早期的膜是各向同性的均匀膜,即现在常用的微孔薄膜,其孔径通常是 0.05～1.0 mm。近几年来生产了一些各向异性的不对称超滤膜,其中,一种各向异性扩散膜是由一层非常薄的、具有一定孔径的多孔“皮肤层”和一层相对厚得多的、更易通渗的、作为支撑用的“海绵层”组成。皮肤层决定了膜的选择性,而海绵层增加了膜的机械强度。由于皮肤层非常薄,因此,高效、通透性好、流量大,且不易被溶质阻塞而导致流速下降。常用的膜一般是由乙酸纤维或硝酸纤维或此二者的混合物制成。近年来为适应制药和食品工业上灭菌的需要,发展了非纤维型的各向异性膜,例如聚砜膜、聚砜酰胺膜和聚丙烯腈膜等。这种膜在 pH 1～14 都是稳定的,且能在 90℃下正常工作。超滤膜通常是比较稳定的,若使用恰当,能连续用 1～2 年。暂时不用时,可浸在 1%甲醛溶液或 0.2% 叠氮化钠(NaN_3)溶液中保存。

超滤膜的基本性能指标主要有:水通量($cm^3\cdot cm^{-2}\cdot h^{-1}$);截留率(以百分率表示);化学物理稳定性(包括机械强度)等。

超滤装置一般由若干超滤组件构成。通常可分为板框式、管式、螺旋卷式和中空纤维式 4 种主要类型。由于经超滤法处理的液体多数含有水溶性生物大分子、有机胶体、多糖及微生物等,这些物质极易黏附和沉积于膜表面上,造成严重的浓差极化和堵塞,成为超滤法最关键的问题。要克服浓差极化,通常可加大液体流量,加强湍流和搅拌。

2.6.5　冰冻干燥

冰冻干燥是指将生物大分子的水溶液冰冻,然后在低温和高真空下使冰升华,留下固体干粉的过程。生物大分子分离纯化后的最终产品多数是水溶液,要从水溶液中得到固体产品,最好的办法就是冰冻干燥。

冰冻干燥得到的生物大分子固体样品有突出的优点:①由于是由冰冻状态直接升华为气态,所以样品不起泡,不暴沸;②得到的干粉样品不黏壁,易取出;③冰干后的样品是疏松的粉末,易溶于水。

冰冻干燥特别适用于那些对热敏感、易吸湿、易氧化及溶剂蒸发时易产生泡沫而引起变性的生物大分子,如蛋白质(酶)、核酸、抗菌素和激素等。

冰冻干燥的过程在冰冻干燥机内完成。冰冻干燥机的国产品牌近年来发展很快,如北京的军事医学科学院生产的小型、中型和大型工业用冰干机,已可以取代昂贵的进口产品。

冰冻干燥的操作十分简单,但以下的注意事项却必须认真记取:

(1) 样品溶液:①样品要溶于水,不含有机溶剂,否则会造成冰点降低,冰冻的样品容易融化,因而减压时会起大量泡沫,使样品变性、污染和损失。同时,若含有有机溶剂,在被抽入真空泵后可溶于真空泵油,使其可达真空度降低而必须换油。②样品要预先脱盐,不可使盐浓度过高,否则冰冻后易融化,影响样品活性,而且不易冻干。③样品缓冲液在冰冻时 pH 可能会有较大变化,例如,pH 7.0 的磷酸盐缓冲液在冰冻时,磷酸氢二钠比磷酸二氢钠先冻结,因而使溶液 pH 下降而接近 3.5,使某些对低 pH 敏感的酶变性失活。此时需加入 pH 稳定剂,如糖类和钙离子等。④样品溶液的浓度不要过稀,例如,蛋白质的浓度以不低于 15 $mg \cdot ml^{-1}$ 为宜。同批冻干的样品液浓度不宜相差太大,以免冻干的时间相差过大。

(2) 样品溶液的容器:①最好用各种尺寸的培养皿盛放样品溶液,液层不要太厚,以免冻干时间太长,耗电太多。也可以使用安瓿瓶和青霉素小瓶。用烧杯时液层厚度不要超过 2 cm,否则烧杯易冻裂。②冻干稀溶液时会得到很轻的绒毛状固体样品,容易飞散而损失或造成污染,因而要用刺了孔的薄膜或吸水纸包住杯口,刺的孔不要过小过少,否则会影响冻干速度。

(3) 溶液冰冻:如有条件,尽可能用干冰-乙醇低温浴速冻,如能使盛有样品溶液的容器边冻边旋转形成很薄的冰冻层,则可以大大加快冻干的速度。

(4) 冻干：①样品全部冻干前，不要轻易摇动，以防水蒸气冲散冻干的样品粉末。②样品冻干达到较高真空度时，容器外部有时会结霜，若外霜消失，则说明样品已冻干，或是仅剩样品中心的小冰块，再稍加延长冻干时间即可。③冻干后要及时取出样品，以免样品在室温下停留时间过长而失活。④停真空泵时要先放气，以免泵油倒灌。放气时要缓慢，以免气流冲散样品干粉。⑤样品冻干后要及时密封冷藏，以防受潮。⑥真空泵要经常检查油面和油色，油面过低或油色发黑，则需换油，通常半年或一季度至少要换一次油。

2.7　固相萃取与固相微萃取

固相萃取(solid phase extraction，SPE)是利用固体吸附剂将液体样品中的目标化合物吸附，与样品的基体和干扰化合物分离，然后再用洗脱液洗脱或加热解吸附，达到分离和富集目标化合物的目的。与液-液萃取相比，固相萃取有很多优点：它不需要大量互不相溶的溶剂，处理过程中不会产生乳化现象；它采用高效、高选择性的吸附剂(固定相)，能显著减少溶剂的用量，简化样品预处理过程；同时所需费用也有所减少。一般说来固相萃取所需时间为液-液萃取的1/2，费用为液-液萃取的 1/5。其缺点是：目标化合物的回收率和精密度都要低于液-液萃取。

SPE 可用于气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、红外光谱(IR)、质谱(MS)、核磁共振(NMR)、紫外-可见光谱(UV/VIS)和原子吸收(AAS)等各种分析方法的样品预处理。SPE 在较复杂的有机化合物分析方面有着广阔的发展前景。

2.7.1　固相萃取的模式及原理

固相萃取实质上是一种液相色谱分离，其主要分离模式也与液相色谱相同，可分为正相(吸附剂极性大于洗脱液极性)、反相(吸附剂极性小于洗脱液极性)、离子交换等几种类型。固相萃取所用的吸附剂也与液相色谱常用的固定相相同，只是在粒度上有所区别。

正相固相萃取所用的吸附剂都是极性的，用来萃取(保留)极性物质。在正相萃取时，目标化合物在保留吸附剂上的保留程度取决于目标化合物的极性官能团与吸附剂表面的极性官能团之间的相互作用，其中包括了氢键，π-π 键相互作用，偶极-偶极相互作用和偶极-诱导偶极相互作用以及其他的极性-极性作用。正相固相萃取可以从非极性溶剂样品中吸附极性化合物。

反相固相萃取所用的吸附剂通常是非极性的或极性较弱的，所萃取的目标化合物通常是中等极性到非极性化合物。目标化合物与吸附剂间的作用是疏水性相

互作用，主要是非极性-非极性相互作用，为范德华力或色散力。

离子交换固相萃取所用的吸附剂是带有电荷的离子交换树脂，所萃取的目标化合物是带有电荷的化合物，目标化合物与吸附剂之间的相互作用是静电吸引力。

2.7.2　固相萃取常用的吸附剂

鉴于固相萃取实质上是一种液相色谱的分离，故原则上讲，可作为液相色谱柱填料的材料都可用于固相萃取。固相萃取柱上所加压一般都不大，分离目的只是把目标化合物与干扰化合物和基体分开即可，柱效要求一般不高，故作为固相萃取吸附剂的填料都较粗，一般在 40μm 即可用，粒径分布要求也不严格，这样可以大大降低固相萃取柱的成本。常用于固相萃取的吸附剂类型及用途参见表 2.3。

表 2.3　固相萃取填料[8]

类型（英文描述）	功能团	应用
正相固相萃取填料		
硅胶（silica）	SiOH	分离亲水（极性）杂质，亲水（极性）化合物的纯化
二醇基（diol）	$Si(CH_2)_3OCH_2CHOHCH_2OH$	分离亲水（极性）杂质，亲水（极性）化合物的纯化
氰基（CN）	$Si(CH_2)_3CN$	类固醇类化合物分离
氟罗里硅土（florisil）		分离极性化合物
酸性氧化铝（alumina acid）		分离极性化合物
碱性氧化铝（alumina base）		分离极性化合物
中性氧化铝（alumina neutral）		分离极性化合物
石墨碳（carbon）		分离极性化合物
硅基反相固相萃取填料		
乙基（C2，ethyl）	$SiCH_2CH_3$	分离较大或较疏水的化合物
丙基（nC3，propyl）	$Si(CH_2)_2CH_3$	
丁基（nC4，butyl）	$Si(CH_2)_3CH_3$	
异丁基（iC4，i-butyl）	$SiCH_2CH(CH_3)_2$	
特丁基（tC4，t-butyl）	$SiC(CH_3)_3$	
戊基（C5，penty）	$Si(CH_2)_4CH_3$	
己基（C6，hexyl）	$Si(CH_2)_5CH_3$	
庚基（C7，heptyl）	$Si(CH_2)_6CH_3$	
辛基（C8，octyl）	$Si(CH_2)_7CH_3$	
癸基（C10，ndecyl）	$Si(CH_2)_9CH_3$	
十二烷基（C12，dodecyl）	$Si(CH_2)_{11}CH_3$	
十八烷基（C18，octadecyl）	$Si(CH_2)_{17}CH_3$	分离疏水杂质，疏水化合物的纯化
二十烷基（C20，eicosyl）	$Si(CH_2)_{19}CH_3$	分离最小的或最少的疏水化合物
三十烷基（C30，tricontyl）	$Si(CH_2)_{29}CH_3$	
环己基（cyclohexyl）	$Si-C_6H_{11}$	用于酚类化合物的提取
苯基（phenyl）	$Si-C_6H_5$	用于极性化合物的提取

续表

类型(英文描述)	功能团	应用
硅基阴离子交换固相萃取填料		用于弱阴离子交换(WAX)。适于酸类、环状化合物、胆固醇和其他液体类型化合物的提取
氨丙基(aminopropyl)	$Si(CH_2)_3NH_2$	
氨乙基(n-2 aminoethyl)	$Si(CH_2)_3NH_2(CH_2)_2NH_2$	
二乙基胺(diethylamino)	$Si(CH_2)_3NH(CH_2CH_3)_2$	
氯化季胺(auaternary amine chloride)	$Si(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$	用于强阴离子交换(SAX) 适于酸类、磺酰基氯化物、异氰酸盐和其他亲电化合物
羟基季胺(quaternary amine hydroxide)	$Si(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$	
乙酸季胺(quaternary amine acetate)	$Si(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$	
聚亚胺(polyimine)	$Si(CH_2)_3—R—(NHCH_2CH_2)_x$	
乙二胺-N-丙基(PSA)	$Si(CH_2)_3NHCH_2CH_2NH_2$	用于金属离子的螯合剂
硅基阳离子交换固相萃取填料		
羧酸(carboxylic acid)	$SiCH_2COOH$	用于弱阳离子交换(WCX)
丙磺酸(propylsuyfonic acid)	$Si(CH_2)_3SO_3H$	用于强阳离子交换(SCX)。适于胺类、醇类和其他亲核类化合物
苯磺酸(benzenesulfonic acid)	$Si(CH_2)_3C_6H_4SO_3H$	
三乙酸(triacetic acid)	$Si(CH_2)_3N(CH_2COOH)(CH_2)_2—N(CH_2COOH)_2$	用于金属离子的螯合剂
硅基共聚产品(混合相)固相萃取填料		
氨丙基+C8(aminopropyl+C8)		
季胺+C8(quaternary amine+C8)		
羧酸+C8(carboxylic acid+C8)		同时具有强酸性和疏水性,适合于分离两性组分
丙磺酸+C8(propylsuyfonic acid+C8)		
苯磺酸+C8(benzenesulfonic acid+C8)		
氰基+C8(cyanopropyl+C8)		
环己基+C8(cyclohenxyl+C8)		
硅基共价相固相萃取填料		
环氧基(epoxy)	$Si(CH_2)_3CH_2—CH—CH_2$(CH 与末端 CH_2 经 O 成环)	与蛋白质、胺类和其他亲核化合物形成共价键结合
异氰酸基(isocyanate)	$Si(CH_2)_4NCO$	用于胺类、醇盐类和其他亲核化合物的提取
硫代丙基(thiopropyl)	$Si(CH_2)_3SH$	用于烷化剂、醇类和胺类的提取

固相萃取中吸附剂(固定相)的选择主要根据目标化合物的性质和样品基体(即样品的溶剂)性质。目标化合物的极性与吸附剂的极性非常相似时,可以得到目标化合物的最佳保留(最佳吸附)。两者极性越相似,保留越好(即吸附越好),所以要尽量选择与目标化合物极性相似的吸附剂。例如:萃取碳氢化合物(非极性)时,要采用反相固相萃取(此时是非极性吸附剂)。当目标化合物极性适中时,正、反相固相萃取都可使用。吸附剂的选择还要受样品的溶剂强度(即洗脱强度)的制约。

样品溶剂的强度相对该吸附剂应该是较弱的,弱溶剂会增强目标化合物在吸附剂上的保留(吸附)。溶剂强度在正、反固相萃取中的顺序是不同的。如果样品溶剂的强度太强,目标化合物将得不到保留(吸附)或保留很弱。例如:样品溶剂是正己烷时用反相固相萃取就不合适了,因为正己烷对反相固相萃取是强溶剂,目标化合物将不会吸附在吸附剂上;当样品溶剂是水时就可以用反相固相萃取,因为水对反相固相萃取是弱溶剂,不会影响目标化合物在吸附剂上的吸附。

固相萃取选择分离模式和吸附剂时还要考虑以下几点:①目标化合物在极性或非极性溶剂中的溶解度,这主要涉及淋洗液的选择;②目标化合物有无可能离子化(可用调节 pH 实现离子化),从而决定是否采用离子交换固相萃取;③目标化合物有无可能与吸附剂形成共价键,如形成共价键,在洗脱时可能会遇到麻烦;④非目标化合物与目标化合物在吸附剂上的吸附点上的竞争程度,这关系到目标化合物与干扰化合物是否能很好分离。

2.7.3　固相萃取的装置及操作程序

最简单的固相萃取装置就是一根直径为数毫米的小柱,小柱可以是玻璃的,也可以是聚丙烯、聚乙烯、聚四氟乙烯等塑料的,还可以是不锈钢的。小柱下端有一孔径为 20μm 的烧结筛板,用以支撑吸附剂。如自制固相萃取小柱没有合适的烧结筛板时,也可以用填加玻璃棉来代替筛板,起到既能支撑固体吸附剂,又能让液体流过的作用。在筛板上填装一定量的吸附剂(100～1000mg,视需要而定),然后在吸附剂上再加一块筛板,以防止加样品时破坏柱床(没有筛板时也可以用玻璃棉替代)。目前已有各种规格的、装有各种吸附剂的固相萃取小柱出售,使用起来十分方便。

固相萃取的一般操作程序如下:

(1) 活化吸附剂:在萃取样品之前要用适当的溶剂淋洗固相萃取小柱,以使吸附剂保持湿润,可以吸附目标化合物或干扰化合物。不同模式固相萃取小柱活化用溶剂不同:①反相固相萃取使用弱极性或非极性吸附剂,通常用水溶性有机溶剂,如甲醇淋洗,然后用水或缓冲溶液淋洗。也可以在用甲醇淋洗之前先用强溶剂(如己烷)淋洗,以消除吸附剂上吸附的杂质及其对目标化合物的干扰。②正相固相萃取使用极性吸附剂,通常用目标化合物所在的有机溶剂(样品基体)进行淋洗。③离子交换固相萃取使用离子交换吸附剂,在用于非极性有机溶剂中的样品时,可用样品溶剂来淋洗;在用于极性溶剂中的样品时,可用水溶性有机溶剂淋洗,再用适当 pH 并含有一定有机溶剂和盐的水溶液进行淋洗。

为了使固相萃取小柱中的吸附剂在活化后到样品加入前能保持湿润,应在活化处理后在吸附剂上面保持大约 1ml 活化处理用的溶剂。

(2) 上样:将液态或溶解后的固态样品倒入活化后的固相萃取小柱,然后利用

抽真空、加压或离心的方法使样品进入吸附剂。

(3) 洗涤和洗脱：在样品进入吸附剂，目标化合物被吸附后，可先用较弱的溶剂将弱保留干扰化合物洗掉，然后再用较强的溶剂将目标化合物洗脱下来，加以收集。淋洗和洗脱同前所述一样，可采用抽真空、加压或离心的方法使淋洗液或洗脱液流过吸附剂。

如果选择对目标化合物吸附很弱或不吸附、而对干扰化合物有较强吸附的吸附剂时，也可让目标化合物先淋洗下来加以收集，而使干扰化合物保留(吸附)在吸附剂上，两者得以分离。在多数的情况下，是使目标化合物保留在吸附剂上，最后用强溶剂洗脱，这样更有利于样品的净化。为了方便固相萃取的使用，很多厂家除了生产各种规格和型号的固相萃取小柱之外，还研制开发出了很多固相萃取的专用装置，使固相萃取使用起来更加方便简单。

2.7.4　血清/血浆中高丰度蛋白的去除

血清/血浆一直被公认为是在各种生理状态下产生生物标志物的重要源泉。血清/血浆中所含的蛋白质达 60～80 $mg \cdot ml^{-1}$，约 10 000 种，包括维持机体正常生理状态的成千上万种蛋白质，各种病理、生理状态下机体细胞和组织分泌、脱落的蛋白质，而且在单样品中所含蛋白质的浓度范围很宽，达到 9～12 个数量级。疾病标志物常常是在疾病过程中由机体分泌到血清中的低丰度蛋白质，因此，人类蛋白质组研究组织(Human Proteome Organization，HUPO)于 2002 年启动了有 13 个国家的 35 个实验室参与的人类血浆蛋白质组研究计划(plasma proteome project，PPP)，目前该计划已取得了阶段性成果[9]。

从复杂的血清/血浆样品中寻求生物标志物，其关键的第一步是去除样品中占主导地位的高丰度蛋白质。血清/血浆样品中，高丰度蛋白质主要是白蛋白、转铁蛋白、结合珠蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、免疫球蛋白 A 和免疫球蛋白 G 这 6 种蛋白质，它们占血清/血浆中蛋白质质量数的 85%。目前，从血清中除去高丰度蛋白质的方法主要有亲和柱色谱法和化学试剂除去法。PPP 计划比较了 35 个实验室去除血清中高丰度蛋白质的实验结果发现，选用安捷伦的蛋白质清除专用柱和贝克曼的 IgY 分离柱具有很好的分离效果，该法将成为血清蛋白质组研究的主要技术手段[18]。通过去除血清中的高丰度蛋白质：①可以使结合在白蛋白、免疫球蛋白上的低丰度蛋白质解离出来并富集；②可以使接下来的 2-DE 图像更加清晰；③减少 2-DE 的斑点数，提高对 2-DE 斑点进行质谱分析的准确度；④提高 2-DE 上低丰度蛋白质的载容量和大分子质量的蛋白质分子的分辨率，提高低丰度蛋白质被识别的概率，尤其是生物标志物被识别的概率。

人体血清/血浆中高丰度蛋白清除柱是一种新型的混合床免疫亲和柱，由抗-白蛋白-树脂、抗-转铁蛋白-树脂、抗-结合珠蛋白-树脂、抗-α-1-抗胰蛋白酶-树脂、

抗-免疫球蛋白 A-树脂、抗-免疫球蛋白 G-树脂这 6 种免疫亲和材料以特定比率混合后，装填成色谱柱的形式而成。每一支柱可以做 200 次人体血样，单次总运行时间(包括进样、洗脱、再生)为 14 min。

2.7.5　固相微萃取

固相微萃取(solid phase micro-extraction，SPME)是在固相萃取基础上发展起来的一种新的萃取分离技术[10]，与液-液萃取和固相萃取相比，具有操作时间短、样品量小、无需萃取溶剂、适于分析挥发性与非挥发性物质、重现性好等优点。固相微萃取装置外型如一只微量进样器，由手柄(holder)和萃取头或纤维头(fiber)两部分构成。萃取头是一根 1cm 长、涂有不同吸附剂的熔融纤维，接在不锈钢丝上，外套细不锈钢管(保护石英纤维不被折断)；纤维头在钢管内可伸缩或进出，细不锈钢管可穿透橡胶或塑料垫片进行取样或进样。手柄用于安装或固定萃取头，可永远使用。固相微萃取关键在于选择不同石英纤维上的涂层(吸附剂)，要使目标化合物能吸附在涂层上，而干扰化合物和溶剂不吸附，一般是在目标化合物是非极性时选择非极性涂层，而目标化合物是极性时选择极性涂层。

固相微萃取的采样方法是将固相微萃取针管(不锈钢套管)穿过样品瓶密封垫，插入样品瓶中，然后推出萃取头，将萃取头浸入样品(浸入方式)或置于样品上部空间(顶空方式)进行萃取。萃取时间大约为 2～30min，以达到目标化合物吸附平衡为准。最后缩回萃取头，将针管拔出。固相微萃取可用于气相色谱，也可用于液相色谱。用于 GC 时，是将固相微萃取针管(不锈钢套管)插入 GC 进样口，推手柄杆，伸出纤维头，使用进样口的高温热解吸目标化合物，解吸后被载气带入色谱柱。用于 HPLC 时，是将固相微萃取针管(不锈钢套管)插入固相微萃取/HPLC 接口解吸池，然后再利用 HPLC 的流动相通过解吸池洗脱目标化合物，并将目标化合物带入色谱柱。

参考文献

[1] Naylor S. *Expert Rev. Proteomics*. 2004, **1**: 11
[2] Emmert-Buck M R. *Science*. 1996, **274**: 998
[3] Bonner R F. *Science*. 1997, **278**: 1481
[4] Simone N L. *Trends Genet*. 1998, **14**: 272
[5] Banks R E. *Electrophoresis*. 1999, **20**: 689
[6] Curran S. *Mol. Pathol*. 2000, **53**: 64
[7] 吴冠芸，潘华珍，吴羣.生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京：科学出版社，2002.91
[8](美)United Chemical Technologies (UCT)公司商品资料(http://www.unitedchem.com/;http://www.innosep.cn/)
[9] Gilbert S O, David J S, Marcin A. *Proteomics*. 2005, **5**: 3226
[10] Arthur C L, Pawliszyn J. *Anal. Chem*. 1990, **62**: 2145

第 3 章　液相柱色谱技术

色谱法(chromatography),又称层析法,是一类分离分析技术的总称,通常是指混合物组分在一种流动载体(称为流动相,mobile phase)的带动下,通过一个表面积很大的固定床(称为固定相,stationary phase)而流出,因各组分与固定相的相互作用不同导致流出的顺序不同而达到分离的目的。

色谱法的种类很多,按流动相的性质可分为液相色谱法、气相色谱法及超临界流体色谱法;按分离原理可分为吸附色谱法、分配色谱法、离子交换色谱法、排阻色谱法、亲和色谱法等;按固定相状态可分为柱色谱法和平面色谱法。

柱色谱法的流动相为高压液体时,就称为高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,HPLC)。HPLC 是现代分析化学中最重要的分离分析方法之一,它具有下列主要优点:①应用了颗粒极细(一般为 10 μm 以下)、规则均匀的固定相,柱效高,分离效率高;②采用高压输液泵输送流动相,流速快,分析速度快,一般试样的分析仅需数分钟,复杂试样分析在数十分钟内即可完成;③检测灵敏度高,常用的紫外检测器最小检测限可达 10^{-9} g,而荧光检测器最小检测限可达 10^{-12} g;④不受试样挥发性和热稳定性的限制,应用范围广;⑤可选用不同性质的溶剂作流动相,分离的选择性高;⑥一般在室温条件下进行分离,不需要高柱温。

由于 HPLC 具有上述种种优点,因此,在各种复杂体系,尤其是生物样品的分离分析中发挥着极其重要的作用,已成为生物分析化学实验室的必备技术手段,广泛应用于分析及制备规模的样品分离分析、纯化和预浓缩、化学及生物化学过程的监测等。

在生物分析化学中,低压、中压色谱也是目前常用的液相柱色谱技术。它使用的固定相种类多、适用面广,主要是各种凝胶。其机械强度不高,但对于生物大分子有良好的分离能力,大部分的分离过程不会导致生物大分子变性;所用设备简单、操作方便、重复性好、样品回收率高。这些优点使其在蛋白质、多肽、核酸、多糖、激素等物质的制备分离、纯化,蛋白质相对分子质量测定,以及样品的脱盐和浓缩等方面有广泛的用途。

3.1　液相柱色谱分析的基本原理

3.1.1　色谱分离过程

实现色谱操作的基本条件是必须具有相对运动的两相,其中的一相固定不动,

即固定相;另一相是携带试样向前移动的流动体,即流动相。固定相装填在色谱柱(column)中。混合试样中的组分随流动相经过色谱柱时,与固定相发生相互作用,由于结构和性质的差异,各组分与固定相作用的类型、强度不同,使其在固定相上的滞留时间或被流动相携带移动的速度不同,产生差速迁移,因而被分离(图 3.1)。

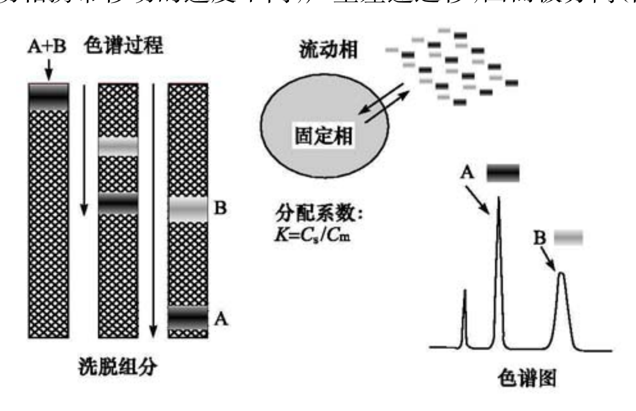


图 3.1　色谱过程示意图

3.1.2　色谱图和峰参数

1. 色谱图

样品流经色谱柱和检测器,所得到的信号-时间曲线,称为色谱图(chromatogram),又称色谱流出曲线(elution profile),如图 3.2 所示。

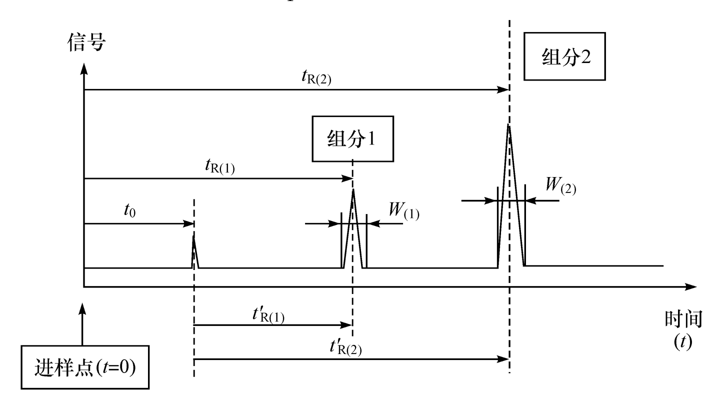


图 3.2　色谱图和色谱峰

2. 峰参数

基线(base line):色谱柱经流动相冲洗,达到平衡后,检测器测出一段时间的

流出曲线，一般应平行于时间轴。

色谱峰(peak)：组分流经检测器时，产生的连续响应信号曲线上的突起部分。正常色谱峰近似于对称形正态分布曲线(高斯曲线)，不对称色谱峰有前延峰(leading peak)和拖尾峰(tailing peak)两种。

峰高(peak height，H)：峰的最高点至峰底的距离。

峰宽(peak width，W)：峰两侧拐点处所作切线与基线的两个交点间的距离。

$$W=4\sigma \tag{3.1}$$

半峰宽(peak width at half-height，$W_{h/2}$)：峰高一半处的峰宽。

$$W_{h/2}=2.355\sigma \tag{3.2}$$

标准偏差(standard deviation，σ)：正态分布曲线 $x=\pm1$ 时(拐点)的峰宽的一半。正常峰的拐点在峰高的 0.607 倍处。标准偏差的大小说明组分在流出色谱柱过程中的分散程度。σ 小，分散程度小、极点浓度高、峰形瘦、柱效高；反之，σ 大，峰形胖、柱效低。

峰面积(peak area，A)：峰与峰底所包围的面积。

3. 定性参数

死时间(dead time，t_0)：不保留组分的保留时间，即流动相(溶剂)通过色谱柱的时间，在反相 HPLC 中可用苯磺酸钠来测定死时间。

死体积(dead volume，V_0)：由进样器进样口到检测器流动池未被固定相所占据的空间。

保留时间(retention time，t_R)：从进样开始到某个组分在柱后出现浓度极大值的时间。

保留体积(retention volume，V_R)：从进样开始到某组分在柱后出现浓度极大值时，流出溶剂的体积，又称洗脱体积。公式中的 F 为流动相平均体积流速。

$$V_R=F\cdot t_R \tag{3.3}$$

调整保留时间(adjusted retention time，t'_R)：扣除死时间后的保留时间。在实验条件(温度、固定相等)一定时，t'_R 只决定于组分的性质，因此，t'_R(或 t_R)可用于定性。

$$t'_R=t_R-t_0 \tag{3.4}$$

调整保留体积(adjusted retention volume，V'_R)：扣除死体积后的保留体积。

$$V'_R=V_R-V_0 \text{ 或 } V'_R=F\times t'_R \tag{3.5}$$

4. 柱效参数

理论塔板数(theoretical plate number，N)：用于定量表示色谱柱的分离效率(简称柱效)。N 取决于固定相的种类、性质(粒度、粒径分布等)、填充状况、柱长、

流动相的种类和流速及测定柱效所用物质的性质。N 与柱长成正比，柱越长，N 越大。用 N 表示柱效时应注明柱长，如果未注明，则表示柱长为1m时的理论塔板数。

理论塔板高度（theoretical plate height，H 或 HETP）：每单位柱长的方差。实际应用时往往用柱长 L 和理论塔板数计算：

$$H = L / N \tag{3.6}$$

5．相平衡参数

分配系数（distribution coefficient，K）：在一定温度下，组分在两相间达到分配平衡时，在固定相中的浓度（C_s）与流动相中的浓度（C_m）之比。

$$K = C_s / C_m \tag{3.7}$$

分配系数与组分、流动相和固定相的热力学性质以及温度、压力有关。在不同的色谱分离机制中，K 有不同的概念：吸附色谱法中为吸附系数，离子交换色谱法中为选择性系数（或称交换系数），凝胶色谱法中为渗透参数，但一般用分配系数来表示。在条件（流动相、固定相、温度和压力等）一定，样品浓度很低（C_s、C_m 很小）时，K 只取决于组分的性质，而与浓度无关。在同一色谱条件下，样品中 K 值大的组分在固定相中滞留时间长，后流出色谱柱；K 值小的组分则滞留时间短，先流出色谱柱。混合物中各组分的分配系数相差越大，越容易分离，因此，混合物中各组分的分配系数不同是色谱分离的前提。在 HPLC 中，固定相确定后，K 主要受流动相性质影响。实践中主要靠调整流动相的组成配比及 pH，获得组分间的分配系数差异及适宜的保留时间，达到分离的目的。

容量因子（capacity factor，k）：组分在两相间达到分配平衡时，在固定相中的质量（m_s）与流动相中的质量（m_m）之比。

$$k = m_s / m_m \tag{3.8}$$

分配系数、容量因子与保留时间之间有如下关系：

$$k = m_s / m_m = C_s V_s / C_m V_m = K \cdot V_s / V_m = t'_R / t_0 \tag{3.9}$$

容量因子表示一个组分在固定相中停留的时间（t'_R）是不保留组分保留时间（t_0）的几倍。$k=0$ 时，化合物全部存在于流动相中，在固定相中不保留，$t'_R=0$。k 越大，说明固定相对此组分的容量越大，出柱慢，保留时间越长。容量因子与分配系数的不同点是：K 取决于组分、流动相、固定相的性质及温度，而与体积 V_s、V_m 无关；k 除了与性质及温度有关外，还与 V_s、V_m 有关。由于 t'_R、t_0 较 V_s、V_m 易于测定，所以，容量因子比分配系数应用更广泛。

选择性因子（selectivity factor，α）：相邻两组分的分配系数或容量因子之比。

$$\alpha = K_2 / K_1 = k_2 / k_1 \text{（设 } k_2 > k_1\text{）} \tag{3.10}$$

因 $k = t'_R / t_0$，则 $\alpha = t'_{R2} / t'_{R1}$，所以，α 又称为相对保留时间。要使两组分得到

分离，必须使 $\alpha \neq 1$。α 与组分在固定相和流动相中的分配性质、柱温有关，与柱尺寸、流速、填充情况无关。从本质上来说，α 的大小表示两组分在两相间的平衡分配热力学性质的差异，即分子间相互作用力的差异。

6. 分离参数

分离度(resolution，R)：相邻两峰的保留时间之差与平均峰宽的比值，也叫分辨率，表示相邻两峰的分离程度。

$$R=\frac{2(t'_{R2}-t'_{R1})}{W_1+W_2} \tag{3.11}$$

当 $W_1=W_2$ 时，$R=0$。当 $R=1$ 时，称为 4σ 分离，两峰基本分离，裸露峰面积为 95.4%，内侧峰基重叠约 2%。$R=1.5$ 时，称为 6σ 分离，裸露峰面积为 99.7%。$R \geqslant 1.5$ 称为完全分离，《中国药典》规定定量分析时，R 应大于 1.5[1]。

基本分离方程：分离度与三个色谱基本参数有如下关系：

$$R=\underset{a}{\frac{\sqrt{n}}{4}} \cdot \underset{b}{\frac{\alpha-1}{\alpha}} \cdot \underset{c}{\frac{k_2}{1+k_2}} \tag{3.12}$$

式中，a 为柱效项；b 为柱选择性项；c 为柱容量项。a 项与色谱过程动力学特性有关，b、c 项与色谱过程热力学因素有关。从基本分离方程可看出，提高分离度有三种途径：①增加塔板数。可通过增加柱长或降低塔板高度来实现，但前者会相应增加保留时间和柱压。②增加选择性。一般可以采取以下措施来改变选择性：改变流动相的组成及 pH；改变柱温；改变固定相。③改变容量因子。可以通过调节流动相组成来实现，这是提高分离度最容易的方法。当 k_2 趋于 0 时，R 也趋于 0；k_2 增大，R 也增大。但 k_2 不能太大，否则不但分离时间延长，而且会使峰形变宽，影响分离度和检测灵敏度。一般 k_2 在 1～10 范围内，最好为 2～5，窄径柱可更小些。

3.2 描述色谱过程的速率理论

色谱分离包括两个基本的过程：①差速迁移。每一种组分通过色谱柱时，都有在流动相和固定相间多次“分配”的过程，由于各种组分与两相的相互作用不同，在柱内的迁移速度不同，这是实现分离的基础。②谱带展宽。流动相携带组分通过色谱柱时，由于线速度快，组分在固定相与流动相间不可能达到真正的“分配”平衡；同时，还存在组分在色谱柱中的纵向扩散，这些因素导致被分离组分的谱带逐渐变宽而使柱效下降。

因此，色谱分离的好坏是由差速迁移和谱带展宽所决定的。只有最大限度地实现差速迁移和抑制谱带展宽才能得到理想的色谱分离结果。

荷兰学者 Deemter 在充分考虑组分在两相间扩散和传质过程的基础上，从动力学理论方面研究了使色谱峰展宽而影响塔板高度的因素，提出了色谱过程动力学理论——速率理论。速率理论可用 Deemter 方程表述，其简化形式为

$$H = A + B/u + Cu \tag{3.13}$$

式中，H 表示理论塔板高度；A 表示涡流扩散系数，是指在填充色谱柱中，由于填料粒径大小不等，填充不均匀，使同一组分的分子经过多个不同长度的途径流出色谱柱而引起的色谱峰展宽的系数；B 表示纵向扩散系数，表示由于浓度梯度的存在，组分将向区带前、后扩散，造成谱带展宽的系数；C 表示传质阻抗系数，表示组分在溶解、扩散、转移的传质过程中所受到的阻力系数；u 为流动相线速度（$mm \cdot s^{-1}$），可由柱长和死时间求得。

A、B、C 三项对色谱峰展宽的影响可见图 3.3。

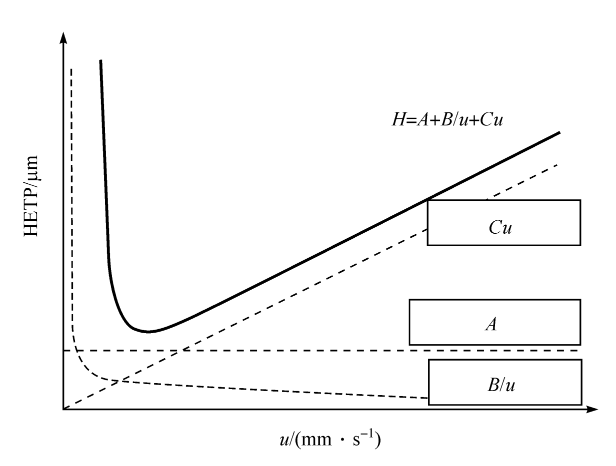


图 3.3　A、B、C 三项对谱带展宽的贡献

图 3.3 中的三条虚线分别表示涡流扩散、纵向扩散和传质阻抗与流动相流速的关系，实线称为板高-流速（H-u）曲线，反映了 A、B、C 三项对谱带展宽的总贡献以及与流动相流速的关系。

由该图可以看出，涡流扩散项 A 与流速无关。$A = 2\lambda d_p$，它只受固定相平均粒径（d_p）和填充均匀性的影响（λ 为填充不规则因子）。

B/u 为纵向扩散项。$B = 2\gamma D_m$，γ 为与填充有关的因子，反映固定相颗粒对分子扩散的阻碍；D_m 为组分在流动相中的扩散系数。在 HPLC 中，流动相线速度很低时，纵向扩散对 H 有明显的影响，随着流动相线速度的增加，这种影响迅速减小。

Cu 为传质阻抗项。传质阻抗既存在于固定相中，也存在于流动相中。

$$Cu = C_s u + C_m u + C_{sm} u \tag{3.14}$$

式中，$C_s u$ 表示固定相传质阻抗；$C_m u$ 表示流动相传质阻抗；$C_{sm} u$ 表示静态流动相传质阻抗。在 HPLC 中，固定相多为单分子层，$C_s u$ 可以忽略。

因此，HPLC 中的 Deemter 方程表述形式为

$$H = A + C_m u + C_{sm} u \tag{3.15}$$

由式(3.15)可知，HPLC 流动相的流速不宜过快，分析型 HPLC 一般流量为 1 ml · min^{-1}左右。

由于 A、C_m 和 C_{sm} 均随固定相平均粒径(d_p)的变小而变小，并且，固定相粒径越小，H 受流动相线速度的影响也越小，因此，小的 d_p 值是保证 HPLC 高柱效的主要措施，见表 3.1、图 3.4。

表 3.1 固定相粒径与柱效关系

固定相平均粒径/μm	柱效	最佳线速度范围
10	较低	窄
5～3	提高	较宽
1.7	$1\times10^5\sim3\times10^5$	非常宽

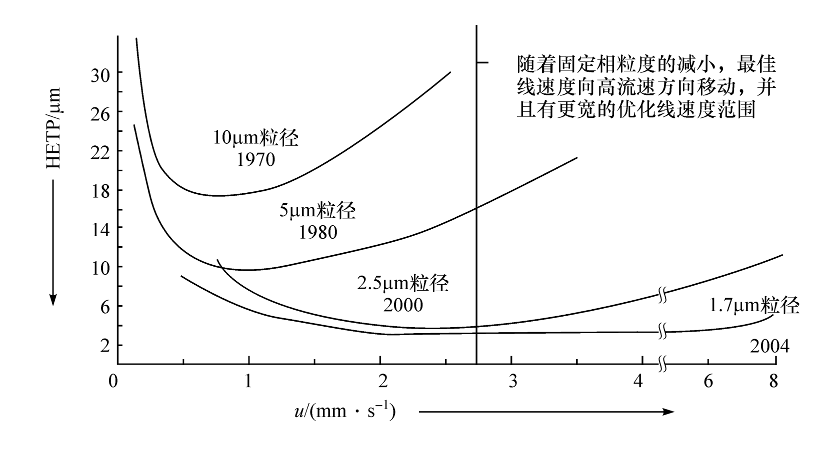


图 3.4 固定相平均粒径对 HETP 及 H-u 曲线的影响

2004 年，Waters 公司在其开发的超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography，UPLC)系统中，使用了平均粒径为 1.7 μm 的亚 2 μm 商品化固定相，柱效达到 $1\times10^5\sim3\times10^5$，而且 H-u 曲线趋于平缓，这就可以在相当宽的线速度范围内保持高的柱效，从而允许使用更高的流速实现快速分离。例如，对于常规 HPLC 分析需要 30 min 的样品，使用 UPLC 仅需 5 min 即可完成[2～4]。

3.3　HPLC 系统

HPLC 系统一般由输液泵、进样器、色谱柱、检测器、数据处理和计算机控制系统等组成，其中，输液泵、色谱柱、检测器是三大关键部件。目前的 HPLC 系统大多配置有梯度洗脱装置、在线脱气机、自动进样器、预柱或保护柱、柱温控制器等。

现代 HPLC 系统均采用计算机色谱工作站进行自动化仪器控制和数据处理，其基本工作流程见图 3.5。

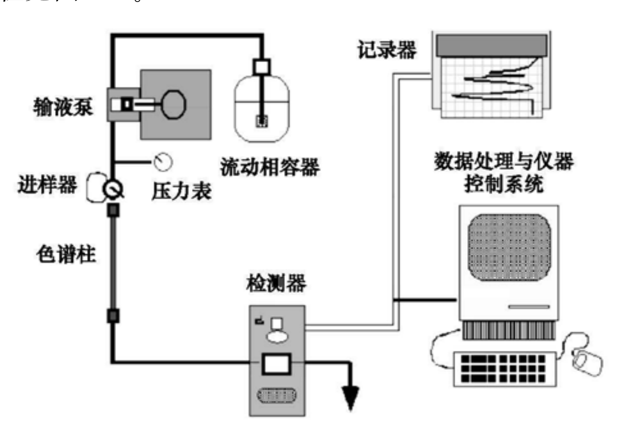


图 3.5　HPLC 流程图

3.3.1　输液泵

输液泵(pump)是 HPLC 系统的关键部件之一。泵的性能直接影响到整个系统的状态和分析结果的可靠性。理想的输液泵应具备如下性能：①流量稳定，其 RSD 应小于 0.5%，这对定性定量的准确性至关重要；②流量范围宽，分析型应在 0.1～10 ml · min^{-1} 范围内连续可调，制备型应能达到 100 ml · min^{-1}；③输出压力高，一般应能达到 150～300 kg · cm^{-2}；④液缸容积小；⑤密封性能好，耐腐蚀。

泵的种类很多，目前应用最多的是柱塞往复泵(图 3.6)，它具有下述优点：液缸容积可小至 0.1 ml，易于清洗和更换流动相，特别适合于再循环和梯度洗脱；通过改变电机转速能方便地调节流量，使流量不受柱阻影响；泵压可达 400 kg · cm^{-2}。其主要缺点是输出的脉冲性较大，现多采用双泵系统来克服。双泵系统按泵的连接方式可分为并联式和串联式，并联式的流量重现性较好(RSD 为 0.1%左右，串联泵 RSD 为 0.2%～0.3%)，但出故障的机会较多(因多一个单向阀)，价格较贵。

HPLC 有等强度洗脱(isocratic elution)和梯度洗脱(gradient elution)两种方式。等强度洗脱是在同一个分析周期内流动相组成保持恒定，适合于组分数目较

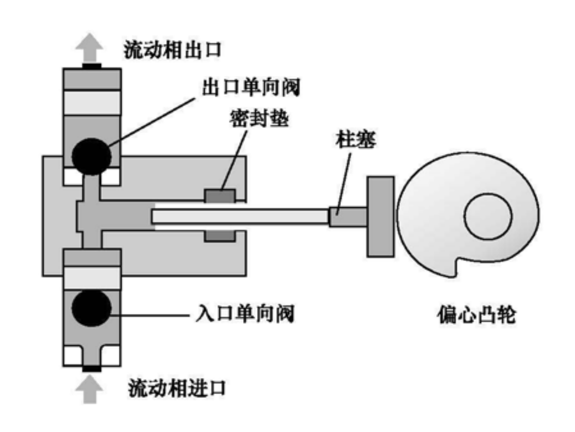


图 3.6　柱塞往复泵结构示意图

少、性质差别不大的样品。梯度洗脱是在一个分析周期内程序控制流动相的组成，如溶剂的极性、离子强度和 pH 等，用于分析组分数目多、性质差异较大的复杂样品。采用梯度洗脱可以缩短分析时间，改善峰形，提高分离度和检测灵敏度，但是常常引起基线漂移和降低重现性。梯度洗脱有两种实现方式，即低压梯度(外梯度)和高压梯度(内梯度)。两种溶剂组成的梯度洗脱可按任意程度混合，即有多种洗脱曲线，为线性梯度、凹形梯度、凸形梯度和阶梯形梯度。线性梯度最常用，尤其适合于在反相柱上进行梯度洗脱。

3.3.2　进样器

HPLC 系统进样装置的要求为：密封性好，死体积小，重复性好，保证中心进样，进样时对色谱系统的压力、流量影响小。目前 HPLC 系统多使用六通进样阀或自动进样器(injector)。六通进样阀耐高压(35～40 MPa)，进样量准确，重复性好(0.5%)，操作方便。自动进样用于大量样品的常规分析。

3.3.3　色谱柱

将固定相装填于耐腐蚀的不锈钢管或高强度塑料管中构成色谱柱(column)，应符合柱效高、选择性好、分析速度快等要求。色谱柱按用途可分为分析型和制备型两类，它们的尺寸规格不同：①常规分析柱(常量柱，conventional column)，内径 2～5 mm(常用 4.6 mm)，柱长 10～30 cm；②窄径柱(narrow bore，又称细管径柱、半微柱，semi-microcolumn)，内径 1～2 mm，柱长 10～20 cm；③毛细管柱(又称微柱，microcolumn)，内径 0.2～0.5 mm；④半制备柱(semi preparative column)，内径大于 5 mm；⑤实验室制备柱(laboratory-scale preparative column)，内径 20～40 mm，柱长 10～30 cm；⑥生产制备柱(large-scale preparative column)，内径可达几

十厘米。具体见表3.2。

表3.2　HPLC中常用的不同内径色谱柱

柱型		柱内径/mm	流动相流速/(μl·min⁻¹)	样品容量/μg	检测灵敏度提高倍数	柱长/cm
	常量柱	4.6	500～2000	100～1000	1	3～25
	细径柱	2.1	200～400	50～500	5	20～50
微柱	微孔填充柱	0.5～1.0	20～60	0.05～0.5	20～25	15～25
	毛细管填充柱	0.1～0.5	1～20	0.001～0.05	80～2000	15～25
	纳米填充柱	0.01～0.1	0.1～1.0	<0.001	2000～10 000	15～40
	半制备柱	8～20	5000～30 000	10 000～50 000		10～30

色谱柱在正确使用时寿命可达两年以上。但是,色谱柱的正确使用和维护十分重要,稍有不慎就会降低柱效、缩短使用寿命甚至损坏。在色谱操作过程中,需要注意下列问题:①避免压力和温度的急剧变化及任何机械震动。②应逐渐改变溶剂的组成。特别是反相色谱中,不应从有机溶剂直接改变为全部是水,反之亦然。③一般说来色谱柱不能反冲,只有生产者指明该柱可以反冲时,才可以反冲除去留在柱头的杂质,否则会迅速降低柱效。④选择使用适宜的流动相(尤其是pH),以避免固定相被破坏。有时可以在进样器前面连接一预柱,如分析柱是键合硅胶时,预柱为硅胶,可使流动相在进入分析柱之前预先被硅胶"饱和",避免分析柱中的硅胶基质被溶解。⑤避免将基质复杂的样品,尤其是生物样品直接注入柱内,需要对样品进行预处理或者在进样器和色谱柱之间连接一保护柱,保护柱一般是填有相似固定相的短柱。⑥经常用强溶剂冲洗色谱柱,清除保留在柱内的杂质。在进行清洗时,对流路系统中流动相的置换应以相混溶的溶剂逐渐过渡,每种流动相的体积应是柱体积的20倍左右,即常规分析需要50～75 ml。⑦保存色谱柱时应将柱内充满乙腈或甲醇,柱接头要拧紧,防止溶剂挥发干燥。绝对禁止将缓冲溶液留在柱内静置过夜或更长时间。⑧以硅胶为基质的填料,只能在pH 2～9范围内使用。⑨装在HPLC仪上的柱子如不经常使用,应每隔4～5天开机冲洗15min。

3.3.4　检测器

检测器(detector)是HPLC仪的三大关键部件之一,其作用是把洗脱液中的组分及它们的量转变为电信号。常用的检测器有紫外吸收、荧光、蒸发光散射、化学发光检测器等。

1. 检测器的性能指标

(1) 噪声和漂移(noise and drift):在仪器稳定之后,记录基线1h,基线带宽为

噪声，基线在 1h 内的变化为漂移。它们反映检测器电子元件的稳定性及其受温度和电源变化的影响，如果有流动相从色谱柱流入检测器，则还反映其受流速（泵的脉动）和溶剂（纯度、含有气泡、固定相流失）的影响。噪声和漂移都会影响测定的准确度，应尽量减小。

（2）灵敏度（sensitivity，*S*）：表示一定量的样品物质通过检测器时所给出的信号大小，是检测器的重要性能指标，要求其灵敏度高。

（3）检测限（detection limit，*D*），指恰好产生可辨的信号时进入检测器的某组分的量，通常用 2 倍或 3 倍噪声表示。$D=2N/S$，式中，N 为噪声，S 为灵敏度。检测限是检测器的一个主要性能指标，其数值越小越好。值得注意的是，分析方法的检测限除了与检测器的噪声和灵敏度有关外，还与色谱条件、色谱柱和泵的稳定性及各种柱外因素引起的峰展宽有关。

（4）线性范围（linear range）：检测器的响应信号与组分量成直线关系的范围，即在固定灵敏度下，最大与最小进样量（浓度型检测器为组分在流动相中的浓度）之比。检测器的线性范围应尽可能大，能同时测定主成分和痕量成分。此外，还要求池体积小，受温度和流速的影响小，能适合梯度洗脱检测等。

（5）池体积：除制备色谱外，大多数 HPLC 检测器的池体积都小于 10 μl。在使用细管径柱时，池体积应减少到 1～2 μl 甚至更低，不然检测系统带来的峰扩张问题就会很严重。

2. 紫外检测器

紫外检测器（ultraviolet detector，UVD）是 HPLC 中应用最广泛的检测器，当检测波长范围包括可见光时，又称为紫外-可见检测器（UV-VISD）。其工作原理是基于 Lambert-Beer 定律。UV-VISD 具有灵敏度高，噪声低，线性范围宽，对流速和温度不敏感的特点，因此，也适用于制备色谱和对光吸收小、消光系数低的物质的微量分析。但要注意流动相中溶剂的紫外吸收截止波长，溶剂中含有的吸光杂质也会提高背景噪声，降低检测灵敏度。此外，梯度洗脱时，还会产生漂移。

UV-VISD 分为固定波长检测器、可变波长检测器和光电二极管阵列检测器（photodiode array detector，PDAD），见图 3.7。PDAD 是一种光学多通道检测器，它可以对每个洗脱组分进行光谱扫描，经计算机处理后，得到光谱和色谱结合的三维图谱。其中，吸收光谱用于定性分析，色谱用于定量分析。

3. 荧光检测器

荧光检测器（fluorescence detector，FD）检测原理基于具有荧光的物质在一定条件下，发射光的荧光强度与物质的浓度成正比。FD 只适用于具有荧光性质的有机化合物（如多环芳烃、氨基酸、胺类、维生素和某些蛋白质等）的测定，其灵敏度

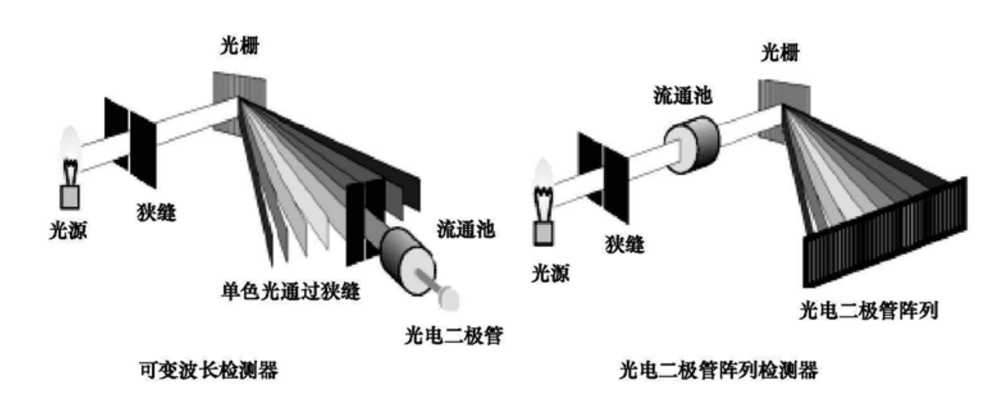


图 3.7　两种 UV-VISD 检测器的原理示意图

很高(检测限为 $10^{-14}\sim10^{-12}$ g · ml^{-1})、选择性好,痕量分析和梯度洗脱的样品均可采用。

4. 蒸发光散射检测器

蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector,ELSD)是基于溶质的光散射性质的检测器,是对柱洗脱液进行喷雾,使流动相溶剂蒸发,留下的不挥发成分用光照射,检测其产生的散射光而获取信号。ELSD 的检测过程分为三步,见图 3.8。

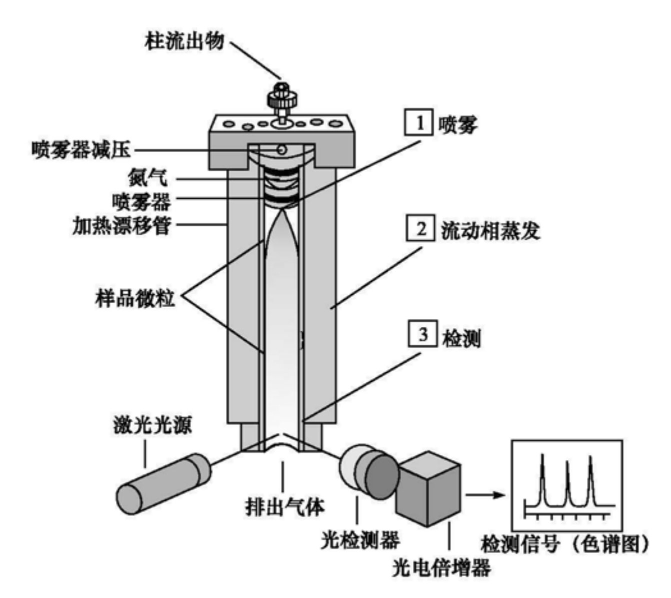


图 3.8　蒸发光散射检测器原理示意图

(1) 柱洗脱液在喷雾器中被高压气流(氮或空气)雾化；

(2) 雾化液滴通过漂移管，流动相中的溶剂被蒸发去除；

(3) 激光束照在溶质颗粒上产生散射光，光收集器收集散射光并通过光电倍增管转变成电信号。

因为散射光强只与溶质颗粒大小和数量有关，而与溶质本身的物理和化学性质无关，所以 ELSD 属通用型和质量型检测器，适合于无紫外吸收、无电活性和不发荧光样品的检测。其灵敏度与载气流速、汽化室温度和激光光源强度等参数有关。它的基线漂移不受温度影响，信噪比高，也可用于梯度洗脱散射光的检测。

3.3.5 数据处理和计算机控制系统

目前，计算机技术的广泛应用使 HPLC 操作更加快速、简便、准确、精密和自动化。计算机的用途包括三个方面：①采集、处理和分析数据；②控制仪器；③色谱系统优化和专家系统。

3.4 液相色谱分离模式

3.4.1 吸附色谱法

吸附色谱法(adsorption chromatography)又称液固色谱法，使用固体吸附剂作为固定相。其主要优点是固定相价格便宜，对样品的负载量大，在 pH 3～8 固定相稳定性较好。该方法适用于脂溶性化合物，如磷脂、甾体化合物、脂溶性维生素、前列腺素等的分离分析，近年来在生物大分子的分离分析方面也日益受到重视。

1. 吸附色谱法原理

吸附色谱法是依据样品中各组分在吸附剂上吸附性能的差别来实现分离的。吸附剂表面存在着分散的吸附中心，溶质分子和流动相分子在吸附中心上进行竞争性吸附，形成不同溶质在吸附剂表面的吸附、解吸平衡。极性越强的化合物在吸附剂上的滞留时间越长。不同类型的有机化合物，在吸附剂上的保留顺序如下：氟碳化合物＜饱和烃＜烯烃＜芳烃＜有机卤化物＜醚＜硝基化合物＜腈＜叔胺＜酯、酮、醛＜醇＜伯胺＜酰胺＜羧酸＜磺酸。

2. 吸附色谱法的固定相

吸附色谱法的固定相分为极性和非极性固定相两类。

1）极性固定相

目前，全多孔球形和无定形硅胶微粒固定相是极性固定相（polar stationary phase）的主体。在HPLC中使用的硅胶粒子，粒径为1.0～10 μm，孔径（多孔性基体中所有孔洞的平均直径）为6～400 nm，比表面积（每克多孔性基体所有内表面积和外表面积的总和）为200～500 $m^2 \cdot g^{-1}$。

近年来，为适应生物大分子分离分析的需要，研制出一些新型的用于生物大分子分离分析的硅胶微粒固定相，如：①新型表面多孔硅胶粒子（modern superficially porous silica particle），其粒径为5 μm、表面多孔壳层厚度为0.25 μm，孔径为30 nm，商品名称为Poroshell。它可以超快速分离多肽、蛋白质等生物大分子。②双重孔径硅胶粒子（bimodal porous silica particle），是有两种不同孔径的表面多孔硅胶，大孔孔径为100 nm，小孔孔径为10 nm。③庞大多孔硅胶粒子（gigaporous silica particle），粒径约20 μm，孔径约为400～800 nm，允许很大的分子进入孔内而无阻碍[5]。

2）非极性固定相

（1）高聚物微球（polymer nanosphere）：由苯乙烯-二乙烯基苯（ethylstyrene-divinylbenzene，PS-DVB）以高交联度共聚制备的全多孔单分散高聚物微球。已有多种商品品种，如：MonoBeads系列和SOURCE系列（Pharmacia公司），凝胶3011（日立公司），Gel-5510（日本柳本），μ-Styragel（Waters公司）等。

这类PS-DVB共聚物微球中，还有一类适用于生物大分子制备分离与纯化的灌注色谱（perfusion chromatography）固定相，称为流通粒子（flow-through particle）。其粒径有10 μm、20 μm、50 μm 3种。颗粒内有两种结构的孔穴：一种是穿透孔（对流孔），贯穿整个颗粒，孔径600～800 nm；另一种是连接孔（扩散孔），孔径50～150 nm，孔深≤1 nm，填料本身的孔穴率约50%。在微球内部，小的连接孔把大的穿透孔连接在一起，这相当于穿透孔把一粒填料分割成许多细小的粒子。其突出特点是由静态流动相所引起的传质阻抗 C_{sm} 大大减小，因而使整个传质过程非常快，提高了柱效。此外，由于穿透孔的存在，使色谱柱的通透性良好，降低了柱的阻力。

（2）聚合物包被固定相（polymer coated stationary phase）：通过在硅胶表面包被上各种聚合物制备。使用的聚合物有多种，如聚丁二烯、PS-DVB共聚物、聚苯乙烯、聚苯烯等。近年还报道使用 Al_2O_3、TiO_2、ZrO_2 等氧化物来制备包被高聚物的固定相。这类固定相可以在pH＞8的碱性介质条件下使用，克服了硅胶表面硅醇基对分离的不利影响，尤其是 TiO_2 和 ZrO_2 包被固定相在机械强度和广pH范围内的稳定性方面均优于硅胶。

(3) 石墨化碳黑(graphitized carbon black):由碳黑在真空中或在惰性气体中经高温(3000℃)加热制成。在碳表面上形成石墨状的晶型,表面均匀,活化点少,大大改善了色谱峰形,提高了分析的再现性。石墨化碳黑可以直接用做固定相进行分离,也可对其进行各种表面处理,以适应对各种有强吸附性的极性化合物样品(例如醇、胺、酮、酸、碱性化合物)的分离。其分离作用除与化合物的极性相关外,还与化合物分子的空间结构(直链、支链、顺式、反式以及邻、间、对位)密切相关。

石墨化碳黑正逐渐成为反相色谱柱填料。这种填料的分离不同于硅胶基质烷基键合相,石墨化碳黑的表面即是保留的基础,不再需其他的表面改性。石墨化碳黑柱填料一般比烷基键合相硅胶或多孔聚合物填料的保留能力更强,可用于分离某些几何异构体。由于在 HPLC 流动相中不会被溶解,这类柱可在任何 pH 与温度下使用。

3. 流动相

在以硅胶为固定相的吸附色谱法中,常用流动相是以弱极性的烷烃(戊烷、己烷、庚烷)为底剂,加入适当的极性调整剂(具有中等极性的溶剂,如:二氯甲烷、氯仿、乙醚、异丙醚、乙酸乙酯、甲基叔丁基醚等)或加入适当的改性剂(极性溶剂,如:四氢呋喃、乙腈、异丙醇、甲醇、水等)组成的二元或多元溶剂系统。依靠流动相溶剂分子与溶质分子竞争固定相的吸附中心,使溶质从色谱柱上洗脱下来。通过调整溶剂的极性,可以控制组分的保留时间,溶剂系统的极性越大,洗脱能力越强,容量因子 k 越小,t_R 越小。

在以 PS-DVB 共聚物微球、石墨化碳黑为固定相的吸附色谱法中,流动相的主体是甲醇、水、乙醇,加入适当的改性剂(乙腈、四氢呋喃)来调节流动相的洗脱强度。

3.4.2　化学键合相色谱法

化学键合相色谱法是使用化学键合固定相(bonded phase)的色谱法。化学键合固定相是指通过化学反应的方式将功能基团键合于基质上而形成的固定相。化学键合相色谱法在 HPLC 中占有极其重要的位置,适用于分离几乎所有类型的化合物,是应用最为广泛的色谱法。其主要优点是:均一性和稳定性好,柱效高,重现性好,键合相和流动相选择范围宽等。

根据固定相和流动相相对极性的不同,键合相色谱法可分为正相键合相色谱法和反相键合相色谱法。

1. 正相键合相色谱法

固定相极性大于流动相极性的键合相色谱法称为正相键合相色谱法。正相键

合相色谱法采用极性键合固定相，是由氨基、氰基、芳硝基、二醇基、醚基等通过烷基链键合在硅胶表面而形成的。流动相与吸附色谱中的流动相相似，也是非极性溶剂或弱极性溶剂，如庚烷、己烷及异辛烷等加入适量极性调整剂（如醇类）。

正相键合相色谱法的分离原理主要是根据化合物在固定相及流动相中的分配系数不同进行分离。强极性组分的容量因子 k 大，后洗脱出柱。流动相溶剂的极性越强，洗脱能力也越强，使组分 k 减小，t_R 减小；反之，k 增大，t_R 增大。它适于分离溶于有机溶剂的极性至中等极性的分子型化合物。

2. 反相键合相色谱法

固定相极性小于流动相极性的键合相色谱法称为反相键合相色谱法。反相键合相色谱法采用非极性键合固定相，是由一些直链烷烃基团，如正辛基、正十八烷基等键合在硅胶表面形成的。反相键合相色谱法的分析对象几乎遍及所有类型的有机化合物，在 HPLC 中，约 70%～80%的工作是由反相键合相色谱法完成的。

反相键合相色谱法主要通过疏溶剂作用滞留溶质，是存在于极性溶剂中的一种非极性相互作用。当极性溶剂中存在非极性（或含有非极性基团）溶质时，非极性溶质分子或溶质分子中的非极性部分之间会产生排斥力，这种排斥力就称为疏溶剂作用。疏溶剂作用的存在使溶质分子从极性溶剂中被“挤”出去，在固定相上产生不同程度的保留。因此，在反相色谱中，疏水性越强的化合物越容易从流动相中被“挤”出去，在色谱柱中滞留的时间也越长。所以，在反相键合相色谱法中，不同的化合物是根据它们的疏水特性得到分离的。

反相键合相色谱法使用的流动相是甲醇、乙腈、水等极性比固定相强的溶剂，乙醇、四氢呋喃、异丙醇及二氧六环等也常被使用。水在流动相中所占比例的伸缩性很大，为 0～100%。流动相溶剂的极性越强，使组分 k 增大，t_R 增大，洗脱能力越弱；反之，k 减小，t_R 减小。可以通过改变流动相的溶剂组成和 pH 影响溶质分子与流动相的相互作用，改变其滞留行为。

3. 化学键合固定相

1）键合固定相的性质和特点

键合相色谱法中的固定相是被共价结合到硅胶载体上的直链饱和烷烃。目前使用的反相键合相主要为硅氧烷（Si—O—Si—C）型键合相，以氯硅烷与硅胶表面的硅醇基进行硅烷化反应而制得。

键合到硅胶表面的直链饱和烷烃的量以含碳量表示，对于商品键合相，含碳量在 2%～50%，一般为 10%。基团的键合量也可用表面覆盖率表示，即参加反应的硅醇基数目占硅胶表面硅醇基总数的比例。含碳量或表面覆盖率越大，对溶质的

保留值也越大。

此外，由于键合基团的空间位阻效应，使硅醇基不能全部参加键合反应，残余硅醇基对键合固定相特别是非极性键合固定相的性能影响很大，它减弱了键合固定相表面的疏水性，对极性溶质产生次级化学吸附，使保留机制复杂化。为减少残余硅醇基，一般在键合反应后，需要使用三甲基氯硅烷进行封尾(end-capping)处理，以降低其吸附性能。

使用键合固定相时应注意：①流动相中水相的 pH 应维持在 2～8，pH＞8.5 会引起基质硅胶的溶解，pH＜1.0 时键合的硅烷会被水解而从柱中洗脱下来；②不同厂家、不同批号的同一类型键合固定相可能会表现出不同的色谱特性。

2）键合固定相的种类

按照固定相键合基团的性质，键合固定相分为非极性、弱极性和极性三类。

（1）非极性键合固定相

这类固定相通常用于反相色谱，表面的键合基团为多种形式的非极性烃基、烃基链等，溶质分子与极性溶剂分子间的排斥力促使溶质分子与键合相的烃基发生疏水缔合，而产生保留行为。十八烷基硅烷键合相(octadecylsilane，ODS 或 C_{18})是应用最为广泛的非极性键合固定相，见图 3.9。其硅胶表面有一层疏溶剂特性较强的 C_{18} 烷基“分子毛”，与极性流动相接触时，其周围形成“疏溶剂腔”，极性流动相中的非极性分子或分子中的非极性部分因疏溶剂作用进入“疏溶剂腔”，与 C_{18} 烷基产生缔合，使溶质在固定相表面产生保留。

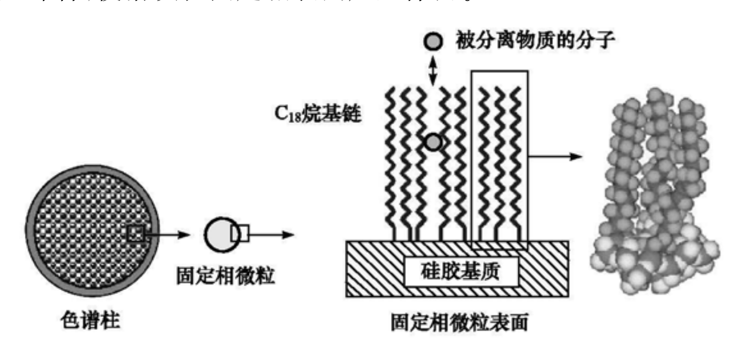


图 3.9　ODS 固定相的结构示意图

非极性键合固定相根据表面键合基团的不同，主要分为以下种类：

① 键合不同长度单一烷基链(如 C_4、C_8、C_{12}、C_{18}、C_{22}、C_{30})的固定相。键合基团的烷基链长、硅醇基对溶质的保留行为、选择性和载样量都有影响。直链饱和烷烃的疏水特性随着烷基链长度的增加而增加，使溶质容量因子 k 增大，保留时间延长，分离选择性改善，载样量提高。而短链烷基键合固定相分析速度较快，对于极

性化合物可以得到较好的色谱峰。

② 键合苯基的固定相,其性能与短链烷基键合固定相类似。

③ 键合长、短两种烷基链(如 C_{18} 和 C_3)的固定相,又称为水平聚合(horizontal polymerization)键合固定相,其硅胶表面的硅醇基全部参加反应,使残留的硅醇基得到有效的保护。

④ 键合 iC_3 和 iC_4 侧链的 C_{18} 烷基链固定相,又称为立体保护键合固定相,它通过立体效应阻碍硅醇基与溶质的相互作用。

⑤ 键合中间镶嵌极性官能团(氨基、酰胺基、季铵基、氨基甲酸酯基)烷基链的固定相,又称为静电屏蔽(electrostatic shield)键合固定相,它通过烷基链中下部镶嵌的极性官能团屏蔽硅醇基与分析物的相互作用。

(2) 弱极性键合固定相

二醇基键合相具有弱极性,可用于3种分离模式,正相及反相分离模式用于分离有机酸及其共聚物,还可用作分离蛋白质的凝胶过滤色谱固定相。

醚基键合相具有斥电子基团,具有弱极性,可用于3种分离模式,正相及反相分离模式适于分离酚类及芳硝基化合物,也可用作分离蛋白质的凝胶过滤色谱固定相。

(3) 极性键合固定相

胺基键合相兼有质子接受体和给予体的双重性能,具有强极性,可用于3种分离模式:正相色谱用于分离极性化合物,如芳胺取代物、脂类、甾族化合物、氯代农药等;反相色谱用于分离单糖、双糖和多糖;还可在酸性水溶液中作为弱阴离子交换剂,用于分离酚、羧酸、核苷酸。

氰基键合相为质子接受体,具有中等极性,可用于两种分离模式:正相色谱用于分离极性化合物;反相色谱可提供与 C_{18}、C_8、苯基柱不同的选择性。

芳硝基键合相具有电荷转移功能,具有弱极性,可用于正相及反相分离模式,对芳香族化合物及多环芳烃的分离有良好的选择性。

4. 流动相

在化学键合相色谱法中,溶剂的洗脱能力(即溶剂强度)与它的极性相关。在正相键合相色谱法中,由于固定相是极性的,所以溶剂的极性越强,洗脱能力越强。在反相键合相色谱法中,由于固定相是非极性的,所以溶剂的极性越强,洗脱能力越弱,而弱极性溶剂具有强的洗脱能力。水是极性最强的溶剂,也是反相键合相色谱中洗脱能力最弱的溶剂。

描述溶剂极性的方法有多种,常用的是溶剂极性参数(polarity parameter, P')法(表3.3)。P'值越大,溶剂的极性越强,在正相键合相色谱中的洗脱能力越强。

表 3.3　常用溶剂的极性参数 P'

溶剂	P'	溶剂	P'
正戊烷	0.0	乙醇	4.3
正己烷	0.1	乙酸乙酯	4.4
苯	2.7	丙酮	5.1
乙醚	2.8	甲醇	5.1
二氯甲烷	3.1	乙腈	5.8
正丙醇	4.0	乙酸	6.0
四氢呋喃	4.0	水	10.2
氯仿	4.1		

键合相色谱中,常使用二元混合溶剂作流动相,此时流动相的极性参数 P'为

$$P'_{mix} = \phi_a P'_a + \phi_b P'_b \tag{3.16}$$

式中,P'_a、P'_b 分别为溶剂 A 和溶剂 B 的极性参数;ϕ_a、ϕ_b 分别为溶剂 A 和溶剂 B 在混合溶剂中所占的体积分数。按照此公式对反相键合相色谱使用的二元混合溶剂流动相的计算实例如下:

40%甲醇-水溶液的极性参数为:$P'_{mix}=0.4\times5.1+0.6\times10.2=8.160$

48%乙腈-水溶液的极性参数为:$P'_{mix}=0.48\times5.8+0.52\times10.2=8.088$

35%四氢呋喃-水溶液的极性参数为:$P'_{mix}=0.35\times4.0+0.65\times10.2=8.030$

由计算可知,上述三种混合溶剂的极性顺序为:40%甲醇-水溶液>48%乙腈-水溶液>35%四氢呋喃-水溶液。

可通过改变流动相来改善色谱分离的选择性,主要有以下方法。

1) 调节流动相的极性

在 HPLC 分析中,为使溶质获得良好的分离,通常希望溶质的容量因子 k 值保持在 1～10。若溶质的 k 值大于 10 或小于 1 时,可通过调节流动相的极性,来获取适宜的 k 值。

正相键合相色谱中,固定相的极性大于流动相的极性,因此,若 k 值大于 10 或小于 1,可通过增加或减小流动相极性,调整溶质 k 值至 1～10;而反相键合相色谱的调节方法则反之。

2) 向流动相中加入改性剂

(1) 离子抑制色谱法(ion suppression chromatography,ISC)

反相键合相色谱中,常加入少量弱酸、弱碱或缓冲溶液来调节流动相的 pH,抑制有机弱酸、弱碱的解离,增加它与固定相的疏水缔合作用,使 k 值位于 1～10。ISC 适用于 $3\leqslant pK_a\leqslant7$ 的弱酸及 $7\leqslant pK_a\leqslant8$ 的弱碱。对于弱酸,降低流动相的

pH，k 值增大，t_R 增大；对于弱碱，提高流动相的 pH，k 值增大，t_R 增大。

（2）离子强度调节法

用反相键合相色谱分析易解离的碱性有机物时，随流动相 pH 的增加，键合相表面的硅醇基与碱阴离子的亲和力增加，从而引起峰形拖尾并干扰分离。可向流动相中加入 0.1%～1%的乙酸盐或硫酸盐、硼酸盐，利用盐效应减弱硅醇基的干扰作用。

向含水流动相中加入无机盐后，会使其表面张力增大。对非离子型溶质，会引起 k 值增加；对离子型溶质，随盐效应的增强，会引起 k 值减小。

3.4.3　反相离子对色谱法

离子对色谱法（pair ion chromatography，PIC）是将一种（或数种）与样品离子电荷相反的离子（称为对离子或反离子，counter ion）加到色谱系统的流动相（或固定相）中，使其与样品离子缔合生成电中性的离子对以改善分离效果的色谱分析方法。PIC 用于分离可离子化或离子型的化合物，分为正相离子对色谱法和反相离子对色谱法两类，因前者应用较少，本节只介绍反相离子对色谱法（reversed-phase paired ion chromatography，RPIC）。

反相离子对色谱法应用面广，适用于有机酸、碱、盐的分离以及用离子交换色谱法无法分离的离子型和非离子型化合物的混合物的分离，如生物碱类、儿茶酚胺类、有机酸类、维生素类以及抗生素类药物及其类似物均可用此法进行分析。

1. RPIC 的分离原理

以有机碱（B）为例说明其分离原理，见图 3.10。通过调节流动相的 pH，使碱转变成正离子 BH^+，BH^+ 与流动相中的离子对试剂（烷基磺酸钠）的反离子 RSO_3^- 缔合生成不荷电的离子对［$BH^+ \cdot RSO_3^-$］，此中性离子对的烷基 R 具有疏水性，增大了离子对在疏水固定相表面保留的能力，从而可以使用反相键合相色谱的模式分离离子性化合物。

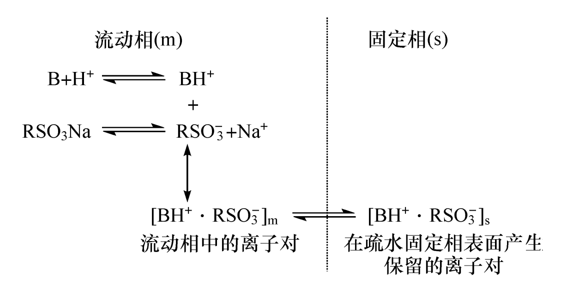


图 3.10　RPIC 分离碱类物质的模式

2. RPIC 容量因子 k 的影响因素

在 RPIC 中，试样组分的容量因子 k 与离子对试剂、流动相有关。

1）离子对试剂的种类和浓度

分析酸类或带负电荷的物质时，一般用季铵盐作离子对试剂，常用的有四丁基铵磷酸盐（TBA）或溴化十六烷基三甲基铵（CTBA）等。分析碱类或带正电荷的物质时，一般用正戊烷基磺酸钠（$PICB_5$）、正己烷基磺酸钠（$PICB_6$）、正庚烷基磺酸钠（$PICB_7$）等。

随着离子对试剂烷基链长、离子对试剂浓度的增加，溶质的 k 值相应增大。但离子对试剂浓度超过一定值时，溶质的 k 值反而会减小，这是由于离子对试剂形成胶束的结果。通常使用的离子对试剂浓度为 $10^{-4} \sim 10^{-2}\ mol \cdot L^{-1}$。

2）流动相

流动相的极性：在离子对色谱中，溶剂的极性并不严格遵循极性参数 P'，因为溶剂的洗脱强度是溶剂溶解离子和离子对能力的函数，而极性参数 P' 是溶剂溶解非离子型化合物能力的函数。因此，离子对色谱中溶剂的洗脱强度可用（$P' + 0.25e$）表示，e 为溶剂的介电常数。

流动相的 pH：由于离子对的形成依赖于试样组分的解离程度，当其处于全部解离的状态时，最有利于离子对的形成，因此，改变流动相的 pH 是改善分离选择性的有效方法。

3.4.4　离子交换色谱法

离子交换色谱法（ion exchange chromatography，IEC）是利用离子交换剂上的荷电基团与被分离的各种离子间的亲和力不同，通过交换平衡实现分离的一种柱色谱法。该法具有灵敏度高，重复性、选择性好，分析速度快等优点，也是常用的色谱法之一。

1. IEC 的基本原理

在 IEC 的分析过程中，用离子交换剂的荷电基团吸附溶液中相反电荷的离子或离子化合物，被吸附的物质随后为带同类型电荷的其他离子所置换而被洗脱。

含有被分离离子的溶液通过离子交换柱时，各种离子即与离子交换剂上的荷电部位竞争性结合。由于各种离子或离子化合物对交换剂的结合力不同，因而洗脱的速率有快有慢。离子的移动速率决定于离子交换剂的亲和力、电离程度和溶液中各种竞争性离子的性质及浓度。

离子交换剂与流动相中离子或离子化合物所进行的离子交换反应是可逆的。以阳离子交换色谱为例说明分离机制如下。RA 表示阳离子交换剂，在溶液中解离出来的阳离子 A^+ 与溶液中的阳离子 B^+ 发生可逆的交换反应，反应式如下：

$$RA + B^+ \rightleftharpoons RB + A^+ \tag{3.17}$$

该反应能以极快的速率达到平衡，平衡的移动遵循质量作用定律。

离子交换剂对溶液中的不同离子具有不同的结合力，结合力的大小取决于离子交换剂的选择性。离子交换剂的选择性可用其反应的平衡常数 K 表示，K 值是反映离子交换剂对不同离子的结合力或选择性的参数，故称 K 值为离子交换剂对 A^+ 和 B^+ 的选择系数。

$$K = [RB][A^+]/[RA][B^+] \tag{3.18}$$

如果反应溶液中 $[A^+]$ 等于 $[B^+]$，则 $K = [RB]/[RA]$。若 $K > 1$，即 $[RB] > [RA]$，表示离子交换剂对 B^+ 的结合力大于 A^+；若 $K = 1$，即 $[RB] = [RA]$，表示离子交换剂对 A^+ 和 B^+ 的结合力相同；若 $K < 1$，即 $[RB] < [RA]$，表示离子交换剂对 B^+ 的结合力小于 A^+。

一般来说，溶液中的离子与交换剂上的离子进行交换，电性越强，越易交换。对于强酸性阳离子交换剂，在常温下，稀溶液中，交换量随交换离子的电价增大而增大，如 $Na^+ < Ca^{2+} < Al^{3+} < Si^{4+}$，若原子价数相同，交换量则随交换离子的原子序数的增加而增大，如 $Li^+ < Na^+ < K^+ < Pb^+$；弱酸性阴离子交换剂的荷电基团(如—COOH)离解受溶液中 H^+ 的抑制，所以 H^+ 的交换能力很强，甚至大于二价、三价阳离子。对于阴离子交换剂，在常温下稀溶液中，强碱性阴离子交换剂与阴离子的结合力次序是：

$CH_3COO^- < F^- < OH^- < HCOO^- < Cl^- < SCN^- < Br^- < CrO_4^{2-} < NO_2^- < I^- < C_2O_4^{2-} < SO_4^{2-} <$ 柠檬酸根；

弱碱性阴离子交换剂与阴离子的结合力次序是：

$F^- < Cl^- < Br^- = I^- = CH_3COO^- < MoO_4^{2-} < PO_4^{3-} < AsO_4^{3-} < NO_3^- <$ 酒石酸根 $<$ 柠檬酸根 $< CrO_4^{2-} < SO_4^{2-} < OH^-$。

两性离子如蛋白质、核苷酸、氨基酸等与离子交换剂的结合力，主要决定于它们的理化性质和特定条件下呈现的离子状态。当 $pH < pI$ 时，它们能被阳离子交换剂吸附，反之，当 $pH > pI$ 时，能被阴离子交换剂吸附。若在相同 pI 条件下，且 $pI > pH$ 时，pI 越高，碱性越强，越容易被阳离子交换剂吸附。

2. 离子交换剂的类型

离子交换剂由基质、荷电基团和反离子构成，在流动相中呈不溶解状态，能释放出反离子。它与流动相中的离子或离子化合物结合时，不会改变自身及被结合离子或离子化合物的理化性质。根据离子交换剂荷电基团所带电荷的不同，可分

为阴离子交换剂和阳离子交换剂。根据离子交换剂中基质的组成及性质，可分为疏水性离子交换剂和亲水性离子交换剂。

1）疏水性离子交换剂

此类交换剂的基质是一种与水亲和力较小的人工合成树脂，最常见的是由苯乙烯与交联剂二乙烯苯反应生成的聚合物，在此结构中再以共价键引入不同的荷电基团。根据荷电基团性质的不同，又可分为阳离子交换树脂、阴离子交换树脂及螯合离子交换树脂。

(1) 阳离子交换树脂。荷电基团带负电，反离子带正电，故此类交换剂可与溶液中的阳离子或带正电荷的化合物进行交换反应。依据荷电基团的强弱，又可将它分为强酸型（含磺酸基—$SO_3^- H^+$）、中强酸型（含磷酸根—PO_3H_2、亚磷酸根—PO_2H_2或磷酸基—O—PO_2H_2）及弱酸型（含羧基—COOH 或酚羟基）3 种。

(2) 阴离子交换树脂。荷电基团为季胺[—$N^+(CH_3)_3$]、叔胺[—$N(CH_3)_2$]、仲胺[—$NHCH_3$]和伯胺[—NH_2]。依据胺基碱性的强弱，又可分为强碱性（含季胺基）、弱碱性（含叔胺、仲胺基）及中强碱性（既含强碱性基团又含弱碱性基团）3 种阴离子交换剂。

(3) 螯合离子交换树脂。这类离子交换树脂具有吸附（或络合）一些金属离子而排斥另一些离子的能力，可通过改变溶液的 pH 提高其选择性。由于它的高选择性，只需用很短的树脂柱就可以把欲测的金属离子浓缩并洗脱下来。

疏水性离子交换剂由于含有大量的活性基团，交换容量大、流速快、机械强度大，主要用于分离无机离子、有机酸、核苷、核苷酸及氨基酸等小分子物质，也可用于从蛋白质溶液中除去表面活性剂（如 SDS）、去污剂（如 TritonX-100）、尿素、两性电解质等。

2）亲水性离子交换剂

亲水性离子交换剂的基质为一类天然的或人工合成的化合物，与水亲和性较大，常用的有纤维素、交联葡聚糖及交联琼脂糖等。

(1) 纤维素离子交换剂。纤维素离子交换剂又称离子交换纤维素，是以微晶纤维素为基质，引入荷电基团构成的。根据引入荷电基团的性质，也可分强酸性、弱酸性、强碱性及弱碱性离子交换剂。目前常用的纤维素交换剂见表 3.4。纤维素离子交换剂适用于分离大分子多价电解质，具有疏松的微结构，对生物高分子物质（如蛋白质和核酸分子）的穿透性较大，表面积大，有较大的吸附容量；其基质是亲水性的，避免了疏水性反应对蛋白质分离的干扰；电荷密度较低，与蛋白质分子结合不牢固，在温和洗脱条件下即可达到分离的目的，不会引起蛋白质的变性。但纤维素分子中只有一小部分羟基被取代，结合在其分子上的解离基团数量不多，故

表 3.4　离子交换纤维素

交换剂(简写)	类型	功能基团	适宜工作 pH
磷酸纤维素(P-C)	中强酸型阳离子交换剂	$—PO_3^{2-}$	pH<4
磺酸乙基纤维素 (SE-C)	强酸型阳离子交换剂	$—(CH_2)_2SO_3^-$	极低
羟甲基纤维素(CM-C)	弱酸型阳离子交换剂	$—CH_2COO^-$	pH>4
三乙基氨基乙基纤维素(TEAE-C)	强碱型阴离子交换剂	$—(CH_2)_2N^+(C_2H_5)_3$	pH>8.6
二乙基氨基乙基纤维素(DEAE-C)	弱碱型阴离子交换剂	$—(CH_2)_2N^+H(C_2H_5)_2$	pH<8.6
氨基乙基纤维素(AE-C)	中等碱型阴离子交换剂	$—(CH_2)_2N^+H_2$	
Ecteda 纤维素(ECTE-C)	中等碱型阴离子交换剂	$—(CH_2)_2N^+(C_2H_4OH)_3$	

交换容量小,仅为交换树脂的 1/10 左右。

(2) 交联葡聚糖离子交换剂。交联葡聚糖离子交换剂是以交联葡聚糖 G-25 和 G-50 为基质,通过化学方法引入荷电基团而制成的。其中,交换剂 G-50 型适用于相对分子质量为 $3\times10^4\sim3\times10^6$ 的物质的分离,交换剂 G-25 型能交换相对分子质量较小($1\times10^3\sim5\times10^3$)的蛋白质。交联葡聚糖离子交换剂的性质与葡聚糖凝胶很相似,在强酸和强碱中不稳定,在 pH 7 时可耐 120℃的高热。它既有离子交换作用,又具有分子筛性质,可根据分子大小对生物高分子物质进行分级分离,但不适用于分级分离相对分子质量大于 2×10^5 的蛋白质。

(3) 琼脂糖离子交换剂。主要以交联琼脂糖 CL-6B (Sepharose CL-6B)为基质,引入电荷基团而构成。这种离子交换凝胶对 pH 及温度的变化耐受力强,可在 pH3～10 和 0～70℃使用,改变离子强度或 pH 时,床体积变化不大。例如,DEAE-Sepharose CL-6B 为阴离子交换剂;CM-Sepharose CL-6B 为阳离子交换剂。它们的外形呈珠状,网孔大,特别适用于相对分子质量大的蛋白质和核酸等化合物的分离,即使加快流速,也不影响分辨率。

3. 离子交换色谱的流动相

离子交换色谱的流动相为盐类缓冲溶液,通过改变 pH、缓冲剂类型、离子强度,加入有机试剂和配位剂等条件来控制容量因子 k,改变交换剂的选择性,进而影响样品待测物的分离。

pH:影响酸或碱的离解平衡,控制组分离子形式所占的分数。当组分以分子形式存在时,则不被保留;离子分数越高,保留值越大。常用的改变 pH 的试剂有柠檬酸盐、磷酸盐、甲酸盐、乙酸盐和氨水等。

离子强度:对保留值的影响比 pH 更大。组分保留值受流动相中盐类总浓度控制。增加外加阴离子或阳离子将增加它们对 R^+ 或 R^- 的竞争能力,使组分保留值减小。通过加入不同种类的盐,可影响柱的选择性,因为不同物质对交换剂的亲

和能力不同。

有机溶剂：外加有机溶剂通常减小组分的保留值。其极性越小，保留值越小。常用的有机溶剂有甲醇、乙醇、乙腈和二氧杂环己烷等。

配离子：当大量 L 和组分 X 随流动相进入柱后，发生配位剂交换：

$$RM\text{-}L + X \rightleftharpoons RM\text{-}X + L \tag{3.19}$$

该法用于分离各种氨基酸或碱类。

在应用离子交换色谱的过程中，常采用梯度洗脱的方式。梯度洗脱一般有两种：一种是增加离子强度的梯度洗脱，所使用的梯度洗脱液是将一种简单的盐（如 NaCl 或 KCl）溶解于稀缓冲液制成；另一种是改变 pH 的梯度洗脱，所使用的梯度洗脱液是用两种不同 pH 或不同缓冲容量的缓冲液制成。对于增加离子强度的梯度洗脱，不管使用何种类型的离子交换剂，其离子强度在绝大部分情况下从低到高递增。而对于改变 pH 的梯度洗脱，则有两种情况：使用阳离子交换剂时，pH 应从低到高递增；使用阴离子交换剂时，pH 应从高到低递减。

4. 离子交换剂的应用选择

应用离子交换色谱技术分离物质时，选择理想的离子交换剂是提高产率和分辨率的重要环节。任何一种离子交换剂都不可能适用于所有的样品物质的分离，因此，必须根据各类离子交换剂的性质以及待分离物质的理化性质，选择一种最理想的离子交换剂进行层析分离。选择离子交换剂的一般原则如下：

(1) 选择阴离子或阳离子交换剂，决定于被分离物质所带的电荷性质。如果被分离物质带正电荷，应选择阳离子交换剂；如带负电荷，应选择阴离子交换剂；如被分离物为两性离子，则一般应根据其在稳定 pH 范围内所带电荷的性质来选择交换剂的种类。

(2) 强型离子交换剂适用的 pH 范围很广，所以常用它来制备去离子水和分离一些在极端 pH 溶液中解离且较稳定的物质。弱型离子交换剂适用的 pH 范围狭窄，在 pH 中性的溶液中交换容量高，用它分离生命大分子物质时，其活性不易丧失。

(3) 离子交换剂处于电中性时常带有一定的反离子，使用时选择何种离子交换剂，取决于交换剂对各种反离子的结合力。为了提高交换容量，一般应选择结合力较小的反离子。据此，强酸型和强碱型离子交换剂应分别选择 H 型和 OH 型；弱酸型和弱碱型交换剂应分别选择 Na 型和 Cl 型。

(4) 交换剂的基质的疏水性与亲水性，与被分离物质间有不同的相互作用（如吸附、分子筛、离子或非离子的作用力等），因此对被分离物质的稳定性和分离效果均有影响。一般认为，在分离生命大分子物质时，选用亲水性基质的交换剂较为合适，它们对被分离物质的吸附和洗脱都比较温和，活性不易被破坏。

3.4.5　凝胶过滤色谱法

用化学惰性的多孔性凝胶作固定相，按固定相对样品中各组分分子体积阻滞作用的差别来实现分离的色谱法称为体积排阻色谱法(size exclusion chromatography,SEC)。其中，以有机溶剂作流动相的体积排阻色谱法，称为凝胶渗透色谱法(gel permeation chromatography, GPC)，主要用于合成高聚物的相对分子质量测定；以水溶液作流动相的体积排阻色谱法，称为凝胶过滤色谱法(gel filtration chromatography,GFC)，用于分离纯化蛋白质、核酸、多糖、激素等物质，还可用于测定蛋白质的相对分子质量，以及样品的脱盐和浓缩等。由于整个色谱过程中一般不变换洗脱液，有如过滤一样，故又称凝胶过滤。本节只讨论凝胶过滤色谱法。

1. 凝胶过滤色谱法的基本原理

凝胶过滤色谱法主要依据凝胶的孔容、孔径分布与样品相对分子质量大小的相互匹配来实现组分的分离。凝胶是一种不带电荷的具有三维空间的多孔网状结构的、呈珠状颗粒的物质，每个颗粒的细微结构及筛孔的直径均匀一致，像筛子。直径大于孔径的分子将不能进入凝胶内部，而是直接沿凝胶颗粒的间隙流出，称为全排出。较小的分子可在容纳它的空隙内自由出入，柱内保留时间长。由此，较大的分子先被洗脱下来，较小的分子后被洗脱下来，从而达到相互分离的目的。洗脱时，峰的位置和该物质相对分子质量有直接的定量关系。

在一根凝胶柱中，颗粒间自由空间所含溶液的体积称为外水体积(V_o)，不能进入凝胶孔径的大分子(假定为A)在洗脱体积为 V_o 时出现洗脱峰。凝胶颗粒内部孔穴的总体积称为内水体积(V_i)，能全部渗入凝胶的那些小分子(假定为B)在洗脱体积为 V_o+V_i 时出现洗脱峰。只有相对分子质量介于A、B之间的组分可以进入凝胶的不同孔穴进行渗透分离，对应的保留体积在 V_o 和 V_o+V_i 之间。通常将A、B之间的相对分子质量范围称为凝胶色谱柱的分级范围。由此可知，只有内水体积 V_i 才是具有分离能力的有效体积。

体积排阻色谱法的分离机制是独特的。由于其洗脱体积仅位于 V_o 和 V_o+V_i 之间，因此，凝胶色谱柱的峰容量有限，在整个色谱图上只能容纳10～12个峰。这表明体积排阻色谱法不能完全分离一个复杂的多组分体系。而且，它对分子大小组成相似或分子大小仅差10%的组分分析并不适用。

2. 凝胶的类型及性质

凝胶都是具有三维空间结构的网状高聚物，有一定的孔径和交联度。它们不溶于水，但在水中有较大的膨胀度，具有良好的分子筛功能，可分离分子大小的范围广，相对分子质量在 10^2～10^8。根据凝胶机械强度的不同，可分为软性凝胶(主

要是糖的聚合物、丙烯酰胺聚合物等)、半刚性凝胶(主要是具有较高交联度的PS-DVB聚合物)、刚性凝胶(主要是具有高交联度的 PS-DVB 聚合物、多孔硅胶、羟基化聚醚多孔微球等)3 类。软性凝胶、半刚性凝胶适用于中、低压色谱,刚性凝胶适用于 HPLC。

表述凝胶固定相及其色谱柱的特性参数有:

(1) 渗透极限:凝胶可用来分离化合物(或组分)相对分子质量的最大值。市售凝胶均按渗透极限的大小来确定产品规格。

(2) 分级分离范围:一种凝胶适用的相对分子质量分离范围。对于在这个范围内的分子,用这种凝胶可以得到较好的线性分离。

(3) 吸水率和床体积:1 g 干凝胶吸收水的体积或者重量,但不包括颗粒间吸附的水分,所以它不能表示凝胶装柱后的体积。而床体积是指 1 g 干凝胶吸水后的最终体积。

(4) 柱体积(V_t):凝胶装柱后,从柱的底板到凝胶沉积表面的体积。在色谱柱中充满凝胶的部分称为凝胶床,因此柱体积又称床体积。

(5) 外水体积(V_o):色谱柱内凝胶颗粒间隙体积的总和。

(6) 内水体积(V_i):流动相可进入的颗粒内部体积的总和。

(7) 峰洗脱体积(V_e):被分离物质通过凝胶柱所需洗脱液的体积。

在生物分析化学中,常用的凝胶有以下几类。

1) 交联葡聚糖凝胶

交联葡聚糖凝胶的商品名称为 Sephadex,是由葡聚糖和 3-氯-1,2-环氧丙烷(交联剂)以醚键相互交联形成的具有三维多孔网状结构的高分子化合物。交联葡聚糖凝胶按其交联度大小分成 8 种型号,以其吸水量($ml \cdot g^{-1}$ 干胶)的 10 倍命名,分别为 G-10、G-15、G-25、G-50、G-75、G-100、G-150、G-200。如 G-25 表示 1g G-25 干凝胶可以吸水 2.5 ml,且数字越小,交联度越大。交联度大的凝胶,网状结构紧密,孔径小,吸水膨胀小,只能分离相对分子质量较小的物质。例如,对于球形蛋白质,大交联度凝胶的分级分离范围为 1000~5000,小交联度凝胶的分级分离范围为 4000~150 000。

交联葡聚糖凝胶在水、盐、碱、弱酸溶液和有机溶剂中较稳定,但当暴露于强酸或氧化剂溶液中,糖苷键易水解断裂。在中性条件下,交联葡聚糖凝胶悬浮液能耐高温,可于 120℃消毒 10min 而不改变其性质。如要在室温下长期保存,应加入适量防腐剂,如氯仿、叠氮化钠等,以免微生物生长。

分别在 Sephadex G-25 和 G-50 中引入羟丙基基团,可形成 LH 型烷基葡聚糖凝胶,型号为 Sephadex LH-20 和 LH-60,适用于以有机溶剂为流动相,分离脂溶性物质(例如,胆固醇、脂肪酸激素等)和天然产物的纯化。

2）琼脂糖凝胶

琼脂糖是从琼脂中分离出来的天然线性多糖，是琼脂去掉其中带电荷的琼脂胶得到的。琼脂糖是由D-半乳糖（D-galactose）和3，6-脱水半乳糖（anhydrogalactose）交替构成的多糖链。它在100℃时呈液态，当温度降至45℃以下时，多糖链以氢键方式相互连接形成双链单环的琼脂糖，经凝聚即成为束状的琼脂糖凝胶。

琼脂糖凝胶的商品名因生产厂家不同而异，常见的有：Sepharose（Amersham Pharmacia Biotech，瑞典）、Bio-gel A（Bio-Rad Laboratories，美国）、Segavac（Sera-vac Laboratories，英国）、Gelarose（Litex，丹麦）等。琼脂糖凝胶对样品的吸附作用很小，在室温下的热稳定性、pH 4～9的化学稳定性、机械强度和孔穴稳定性均优于一般的葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。在高盐浓度下，柱床体积一般不会发生明显变化，使用琼脂糖凝胶时洗脱速率可以比较快。琼脂糖凝胶的排阻极限很大，分离范围很广，适合于分离大分子物质，但分辨率较低。琼脂糖凝胶不耐高温，使用温度以0～30℃为宜。

Sepharose与2，3-二溴丙醇反应，形成Sepharose CL型交联琼脂糖（CL-2B、CL-4B），它的分离特性基本没有改变，但热稳定性和化学稳定性都有所提高，可以在更广泛的pH范围（pH 3～13）内应用，还特别适用于含有有机溶剂的分离。

还有一种高交联度的多孔琼脂糖珠，商品名Superose（Amersham Biosciences）。它分离范围很广，分辨率较高，可以一次性的分离相对分子质量差异较大的混合物，同时它的机械稳定性也很好。

3）聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶是丙烯酰胺（acrylamide）与交联剂甲叉双丙烯酰胺（*N*，*N*′-methylenebisacrylamide）交联而成。改变丙烯酰胺的浓度，就可以得到不同交联度的产物。聚丙烯酰胺凝胶主要由Bio-Rad Bio-Gel Laboratories生产，商品名为Bio-Gel P，主要型号有Bio-Gel P-2到Bio-Gel P-300等10种，后面的数字基本代表它们渗透极限的10^{-3}，数字越大，表示可分离的相对分子质量越大，渗透极限最大的Bio-Gel P-300可达到10^{5}。

聚丙烯酰胺凝胶的分离范围、吸水率等性能基本近似于琼脂糖凝胶，在pH 1～10的水溶液、一般有机溶液、盐溶液中比较稳定，但在较强的碱性条件或较高的温度下易发生分解。

聚丙烯酰胺凝胶还具有以下特性：亲水性很强，基本不带电荷，所以吸附效应较小；不会像葡聚糖凝胶和琼脂糖凝胶那样受微生物污染；对芳香族、酸性、碱性化合物略有吸附作用，但使用离子强度略高的洗脱液就可以避免；在用于蛋白质相对分子质量的测定、核苷及核苷酸的分离纯化时，均能获得理想的结果。

4）烯丙基葡聚糖凝胶（Sephacryl）

Sephacryl 是由烯丙烷基葡聚糖与甲叉双丙烯酰胺（N,N'-methylenebisacrylamide）交联而成的一种新型的葡聚糖凝胶。Sephacryl 的优点是分离范围很大，排阻极限甚至可以达到 10^8，远远大于葡聚糖凝胶。所以，它不仅可以用于分离一般蛋白质，也可以用于分离蛋白多糖、质粒、甚至较大的病毒颗粒。与葡聚糖凝胶相比，Sephacryl 具有更高的化学稳定性，在各种溶剂中很少发生溶解或降解，可以用各种去污剂、胍、脲等作为洗脱液，耐高温，稳定工作的 pH 范围一般为 3～11。另外，Sephacryl 的机械性能较好，比较耐压，可以用较高的流速洗脱，分辨率也较高。所以，Sephacryl 可以实现优于葡聚糖凝胶的快速和较高分辨率的分离。

5）葡聚糖交联琼脂糖凝胶（Superdex）

近年来，各类凝胶技术发展很快，目前已研制出很多性能优越的新型凝胶，例如 Pharmacia Biotech 的 Superdex 和 Superose。Superdex 是由高交联度多孔琼脂糖与葡聚糖共价结合而成。该凝胶具有良好的分子筛特性和物理化学稳定性，分辨率非常高。适用的 pH 范围一般为 3～12，去污剂（如 1% SDS）、解离剂（如 8 $mol \cdot L^{-1}$ 尿素、6 $mol \cdot L^{-1}$ 盐酸胍等）都不会影响分离效果。化学物理稳定性很好，可以用于 FPLC、HPLC 分析。

Superose 的分离范围很广，分辨率较高，可以一次性地分离相对分子质量差异较大的混合物。同时它的机械稳定性也很好。

6）多孔硅胶、多孔玻璃珠

多孔硅胶和多孔玻璃珠都属于硬质无机凝胶，是用硅胶或玻璃制成的具有一定直径的网孔状结构的球形颗粒。它们的最大特点是机械强度很高，化学稳定性好，使用方便而且寿命长。无机胶一般柱效较低，但用微粒的多孔硅胶制成的 HPLC 柱也可以有高达 10^4～10^6 的柱效。它们的最大缺点是对蛋白质和多肽有较强的吸附作用（尤其是多孔硅胶），但可以通过表面处理和选择洗脱液来降低吸附。它们不能使用 pH＞8.5 的碱性溶液作流动相。多孔玻璃珠易破碎，不能填装紧密，所以柱效相对较低。

3. 凝胶的选择

凝胶的选择是使用凝胶色谱分离时，必须考虑的重要方面。一般应注意以下问题：

（1）混合物的分离程度主要决定于凝胶颗粒内部微孔的孔径和混合物相对分子质量的分布范围。凝胶孔径决定了被排阻物质相对分子质量的下限，凝胶的交

联度与凝胶孔径有直接关系。移动缓慢的小分子物质，在低交联度的凝胶上不易分离，大分子物质同小分子物质的分离宜用高交联度的凝胶。例如欲除去蛋白质溶液中的盐类时，可选用 SephadexG-25。

(2) 凝胶的颗粒粗细与分离效果有直接关系。一般来说，细颗粒分离效果好，但流速慢；粗颗粒流速快，但会使区带扩散，使洗脱峰变得平而宽。因此，使用细颗粒凝胶时，宜选用大直径层析柱；用粗颗粒凝胶时，宜选用小直径层析柱。在实际操作中，应根据需要选择适当大小的颗粒并调整流速。

(3) 在选择合适的凝胶种类以后，应根据色谱柱的体积和干胶的溶胀度，按式(3.20)计算所需干胶的用量(g)：

$$干胶用量=\pi r^2 h/溶胀度(床体积/1g\ 干胶) \qquad (3.20)$$

式中，r 为色谱柱半径；h 为色谱柱长度。

考虑到凝胶在处理过程中会有部分损失，将式(3.20)计算结果再增加 10%～20%即为实际干胶用量。

4. 凝胶过滤色谱法的流动相

凝胶过滤色谱法使用以水为基体的、具有不同 pH 的多种缓冲液作流动相，分离原理是分子筛作用。样品与流动相之间基本上不存在相互作用，因此，不可能通过改变流动相的性质和组成来改善分离度。流动相选择的基本原则是：①对样品有较好的溶解能力；②与凝胶相匹配；③与检测器匹配；④尽可能采用低黏度溶剂。

为消除基体可能存在的吸附作用和疏水作用，通常向流动相中加入少量钠、钾、铵盐或磷酸盐等无机盐(如 NaCl、KCl、NH_4Cl 等)，以维持流动相的离子强度在 0.1～0.5。

3.4.6　亲和色谱法

亲和色谱法(affinity chromatography，AC)是以在不同基质(matrix)上键合多种不同极性的配体(ligand)作为固定相，用具有不同 pH 的缓冲溶液作流动相，依据生物分子(氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、核酸、酶等)与基体上所键合的配体之间的特异性亲和作用的差别，来实现对具有生物活性的生物分子的分离。

亲和色谱是分离纯化蛋白质、酶等生物大分子最为特异而且最为有效的色谱分离技术，同时它也可以应用于某些生物大分子结构和功能的研究。亲和色谱具有高度的专一性，分离过程简单、快速，具有很高的分辨率，在生物分析化学中有广泛的应用。

亲和色谱法所利用的特异性可逆结合作用有多种，常用配体见表 3.5。选择并制备合适的亲和吸附剂是亲和色谱的关键步骤，它包括基质和配体的选择、基质的活化、配体与基质的偶联等。

表 3.5 亲和色谱常用体系

常用配体	分离对象
酶	底物、抑制剂、辅酶
抗体	抗原、病毒细胞
外源凝激素	多糖、糖蛋白
核酸	互补碱基序列、组蛋白、核酸聚合物、结合蛋白
激素	受体、载体蛋白
细胞	细胞表面特异蛋白、外源凝激素

1. 亲和吸附剂基质(固相载体)的选择

一种理想的基质应满足下列条件:①基质本身与样品中的各个组分均无明显的非特异性吸附,不影响配体与待分离物的结合。具有较好的亲水性,以使生物分子易于靠近并与配体作用。②能够和配体稳定地结合,并且结合后不改变基质和配体的基本性质。③基质在结合配体后,具有机械性能和化学性质上的稳定性,在改变 pH、离子强度、温度以及变性剂存在的条件下也能正常使用。④具有均匀的多孔网状结构,以使被分离的生物分子能够均匀、稳定地通透,并充分与配体结合。基质的孔径过小会增加基质的排阻效应,使被分离物与配体结合的机率下降,降低亲和层析的吸附容量。所以,一般来说,多选择较大孔径的基质,以使待分离物有充分的空间与配体结合。

常用的基质有纤维素、葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶和多孔玻璃珠等。实践证明,琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶是亲和色谱的优良载体。琼脂糖凝胶结构开放,通过性好,酸碱处理时相当稳定,物理性能也好。琼脂糖凝胶上的羟基在碱性条件下极易被溴化氰活化成亚氨基碳酸盐,并能在温和的条件下与氨基等基团作用而引入配体。亲和色谱中最为常用的琼脂糖凝胶是 Sepharose-4B、Sepharose-6B。

2. 基质的活化

在偶联配体和基质时,通常首先要进行基质的活化。基质的活化是指对基质进行一定的化学处理,使基质表面上的一些化学基团转变为易于和特定配体结合的活性基团。

1) 多糖基质的活化

多糖尤其是琼脂糖是一种常用的基质。琼脂糖通常含有大量的羟基,经过一定的处理可以引入各种适宜的活性基团。琼脂糖的活化方法很多,以下介绍一些

常用的活性基团及活化方法：

(1) 溴化氰(CNBr)活化。溴化氰活化法是最常用的活化方法之一，活化过程主要是生成亚胺碳酸活性基团，它可以和配体的伯氨基(NH_2)反应，主要生成异脲衍生物。溴化氰活化的基质可以在温和的条件下与配体结合，结合的配体量大。溴化氰活化的基质通过进一步处理还可以得到很多其他的衍生物。这种方法的缺点是：基质和配体偶联后生成的异脲衍生物中氨基的 $pK=10.4$，通常会带一定的正电荷，从而使基质可能发生阴离子交换作用，增大了非特异性吸附，影响亲和层析的分辨率；溴化氰活化的基质与配体结合不够稳定，尤其是与小配体结合时，可能会出现配体脱落现象；另外，溴化氰有剧毒、易挥发，所以操作不便。

(2) 环氧乙烷基活化。这类方法活化后的基质全部含有环氧乙烷基。如在含有 $NaBH_4$ 的碱性条件下，1,4-丁二醇-双缩水甘油醚的一个环氧乙烷基可以与羟基反应，而将另一个环氧乙烷基结合在基质上。另外，也可以用环氧氯丙烷活化，将环氧乙烷基结合在基质上。这种活化方法的优点是活化后不引入电荷基团，而且基质与配体形成的 N—C、O—C 和 S—C 键都很稳定，所以配体与基质结合紧密，亲和吸附剂使用寿命长，便于在亲和层析中使用较强烈的洗脱手段，还避免了溴化氰的毒性。它的缺点是用环氧乙烷基活化的基质在与配体偶联时需要碱性条件(pH 9～13)，温度为 20～40℃，这样的条件对于一些比较敏感的配体不适用。

另外，还有多种活化方法，如：N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化、三嗪(triazine)活化、高碘酸盐(periodate)活化、羰酰二咪唑(carbonyldiimidazole)活化、2,4,6-三氟-5-氯吡啶(FCP)活化、乙二酸酰肼(adipic acid dihydrazide)活化、二乙烯砜(divinylsulfone)活化等。总之，目前对基质的活化方法很多，且各有其特点，应根据实际需要合理选用。

2) 聚丙烯酰胺的活化

聚丙烯酰胺凝胶中有大量的甲酰胺基，可以通过修饰甲酰胺基活化聚丙烯酰胺凝胶。一般有以下 3 种方式：氨乙基化作用、肼解作用和碱解作用。另外，在偶联蛋白质配体时也通常用戊二醛活化聚丙烯酰胺凝胶。

3) 多孔玻璃珠的活化

对于多孔玻璃珠等无机凝胶的活化通常采用硅烷化试剂与玻璃反应生成烷基胺-玻璃，在多孔玻璃上引入氨基，再通过这些氨基的进一步反应引入活性基团，与适当的配体偶联的方法。

3. 间隔臂分子的引入

在亲和色谱中，配体与待分离的生物大分子结合时，很大程度上要受到基质和

待分离生物大分子间的空间位阻效应的影响。尤其是当配体较小或待分离生物大分子较大时，由于直接结合在基质上的小分子配体非常靠近基质，待分离生物大分子由于受到基质的空间阻碍，使得其与配体结合的部位无法接近配体，影响了待分离生物大分子与配体的结合，造成吸附量降低。解决这一问题的方法通常是在配体和基质之间引入适当长度的“间隔臂”(spacer arm)，即加入一段有机分子，使基质上配体离开基质的骨架向外扩展伸长，减少空间位阻效应，增加了配体对待分离生物大分子的吸附效率。加入间隔臂的长度要恰当，太短使效果不明显，太长则容易造成自身弯曲，反而降低吸附效率。

引入间隔臂分子常用的方法是将适当长度的氨基化合物 $NH_2(CH_2)_nR$ 共价结合到活化的基质上，R 基团通常是氨基或羧基，n 一般为 2～12。例如，Pharmacia 公司生产的 AH-Sepharose 4B 和 CH-Sepharose 4B 就是分别将 1,6-乙二胺和 6-氨基乙酸与 CNBr 活化的琼脂糖反应引入间隔臂分子。二者的末端分别为氨基或羧基，通过碳二亚胺的缩合作用可以分别与含羧基或氨基的配体偶联。另外，也可以通过进一步的活化处理，生成 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯、环氧基等活性基团直接与各种配体偶联。引入间隔臂的基质与配体结合时，配体就可以离开基质一定的空间，从而减少空间位阻效应，易于与待分离物质结合。

4. 配体的选择

1) 配体的性质

亲和色谱中，选择合适的配体对于获得好的分离结果非常重要。理想的配体应具有以下特性：

① 配体与待分离物质有适当的亲和力，亲和力过弱或过强都不利于亲和层析的分离。亲和力太弱，待分离物质不易与配体结合，使亲和吸附效率很低，在吸附洗脱过程中易受非特异性吸附的影响，引起分辨率下降；如果亲和力太强，待分离物质很难与配体分离，难以洗脱。

② 配体与待分离的物质之间有较强的亲和特异性，而与样品中其他组分没有明显的亲和力。

③ 配体能与基质实现稳定的共价结合，与基质偶联后，对其结构没有明显改变，在实验过程中不易脱落。

④ 配体自身应具有较好的稳定性，在实验中能够耐受偶联以及洗脱过程中的较剧烈的条件，可以多次重复使用。完全满足上述条件的配体实际上很难找到，应根据具体的实验要求来选择尽量满足上述条件的最适宜的配体。

根据配体对待被分离物质亲和性的不同，可以将其分为两类：特异性配体(specific ligand)和通用性配体(general ligand)。特异性配体一般是指只与单一或

很少种类的蛋白质等生物大分子结合的配体，如生物素和亲和素、抗原和抗体、酶和它的抑制剂、激素和受体等。配体的特异性是保证亲和层析高分辨率的重要因素，但寻找特异性配体一般比较困难，尤其对于一些性质不很了解的生物大分子，要找到合适的特异性配体通常需要大量的实验。通用性配体一般是指特异性不是很强，能和某一类蛋白质等生物大分子结合的配体，如各种凝集素（lectine）可以结合各种糖蛋白，核酸可以结合RNA及含RNA的蛋白质等。通用性配体对生物大分子的专一性虽然不如特异性配体，但通过选择合适的洗脱条件也可以得到很高的分辨率。而且这些配体还具有结构稳定、偶联率高、吸附容量高、易于洗脱、价格便宜等优点，所以在实验中得到了广泛的应用。

2）配体与基质的偶联

除了前面已经介绍的一些基质活化基团外，通过对活化基质的进一步处理，还可以得到更多种类的活性基团。这些活性基团可以在较温和的条件下与含氨基、羧基、醛基、酮基、羟基、硫醇基等多种配体反应，使配体偶联在基质上。另外，通过碳二亚胺、戊二醛等双功能试剂的作用也可以使配体与基质偶联。以上这些方法使得几乎任何一种配体都可以找到适当的方法与基质偶联。配体和基质偶联完毕后，必须要反复洗涤，以去除未偶联的配体。另外，要用适当的方法封闭基质中未偶联上配体的活性基团，也就是使基质失活，以免影响后面的亲和色谱分离。例如，对于能结合氨基的活性基团，常用的方法是用2-乙醇胺、氨基乙烷等小分子处理。

配体与基质偶联后，通常要测定配体的结合量以了解其与基质的偶联情况，同时也可以推断亲和层析过程中对待分离的生物大分子的吸附容量。配体结合量通常是用每毫升或每克基质结合的配体量来表示。测定配体结合量的方法很多，如：①差量分析。根据加入配体的总量减去配体与基质偶联后洗涤出来的配体量即可大致推算出配体的结合量。当配体可以用光谱法准确定量时，这种方法还是相当准确的。②直接光谱测量。对于能够吸收250 nm以上波长的配体，可以直接用光谱法测定与基质结合的配体的量。③75℃下与酸或碱作用，而后直接用光谱法测量。④凝胶溶解。以适当的方法将凝胶溶解，如酸或酶水解，使得基质释放出配体或配体的裂解物，利用它们进行分析。⑤2，4，6-三硝基苯磺酸钠（TNBS）分析。利用TNBS与未结合配体的和结合某些配体的基质作用呈现不同的颜色的原理，可以计算出配体结合量。⑥元素分析。如果配体中含有某种特别的元素，通过元素分析就可以确定配体结合量。⑦放射性分析法。偶联中加入一定量带有同位素的配体，通过放射性分析确定配体结合量，是一种非常灵敏的方法。

影响配体结合量的因素很多，包括基质和配体的性质、基质的活化方法及条件、基质和配体偶联反应的条件等。例如，通常溴化氰活化的基质的活性基团比环

氧基活化的基质的活性基团多,配体结合量可能较大。在用溴化氰活化时,增加溴化氰的量及反应的 pH,可以增加基质上活化基团的量,从而增大配体结合量。偶联过程中增加配体的量及增大反应的 pH,也可以增大配体结合量。实验中通常希望配体结合量较高,但应注意增加配体结合量应根据实际情况,还要考虑到其他因素的影响。因为提高配体的结合量不等于提高亲和吸附剂的吸附容量,配体结合量只是影响亲和吸附剂吸附容量的一个因素,除此之外还有很多其他因素,如基质、配体以及待分离物质本身的性质。例如,增大配体的结合量通常可以增加吸附容量,但有些增大配体结合量的条件可能会影响配体的结构,降低配体和待分离物质的亲和力,这样反而会降低亲和吸附剂的吸附容量。实际影响亲和吸附剂吸附容量的因素非常复杂,各种因素的影响都不是绝对的,要获得较高的吸附容量往往要考虑很多因素,并通过实验摸索来选择合适的条件。

目前已有多种活化的基质以及偶联各种配体的亲和吸附剂制成商品出售,可以省去基质活化、配体偶联等复杂的步骤,使用方便,效果好,但一般价格昂贵。

5. 洗脱

亲和色谱的另一个重要的步骤就是要选择合适的条件使待分离物质与配体分开而被洗脱出来。洗脱方法分为两种:特异性洗脱和非特异性洗脱。

1）特异性洗脱

特异性洗脱是指利用洗脱液中的物质与待分离物质或与配体的亲和特性而将待分离物质从亲和吸附剂上洗脱下来。特异性洗脱又分为两种,一种是选择与配体有亲和力的物质进行洗脱,另一种是选择与待分离物质有亲和力的物质进行洗脱。前者在洗脱时,选择一种与配体亲和力较强的物质加入洗脱液,这种物质与待分离物质竞争对配体的结合。在适当的条件下,如这种物质与配体的亲和力强或浓度较大,配体就会基本被这种物质占据,原来与配体结合的待分离物质被取代而脱离配体,被洗脱下来。例如,用凝集素作为配体分离糖蛋白时,可以用适当的单糖洗脱,单糖与糖蛋白竞争对凝集素的结合,可以将糖蛋白从凝集素上置换下来。用后一种方法洗脱时,选择一种与待分离物质有较强亲和力的物质加入洗脱液,这种物质与配体竞争对待分离物质的结合。在适当的条件下,如这种物质与待分离物质的亲和力强或浓度较大,待分离物质就会基本被这种物质结合而脱离配体,被洗脱下来。例如,用染料作为配体分离脱氢酶时,可以选择 NAD^+ 进行洗脱,NAD^+ 是脱氢酶的辅酶,它与脱氢酶的亲和力要强于染料,所以脱氢酶就会与 NAD^+ 结合而从配体上脱离。特异性洗脱的优点是特异性强,可以进一步消除非特异性吸附的影响,从而得到较高的分辨率。另外,对于待分离物质与配体亲和力很强的情况,使用非特异性洗脱方法需要较强烈的洗脱条件,很可能使蛋白质等生

物大分子变性，有时甚至只有使待分离的生物大分子变性才能够洗脱下来，使用特异性洗脱则可以避免这种情况。由于亲和吸附达到平衡比较慢，所以特异性洗脱往往需要较长时间和较大的洗脱条件，可以通过适当的改变其他条件，如选择亲和力强的物质洗脱、加大洗脱液浓度等，来缩小洗脱时间和洗脱体积。

2）非特异性洗脱

非特异性洗脱是指通过改变洗脱缓冲液 pH、离子强度、温度等条件，降低待分离物质与配体的亲和力而将待分离物质洗脱下来。当待分离物质与配体亲和力较小时，一般通过连续大体积平衡缓冲液冲洗，就可以在杂质之后将待分离物质洗脱下来。这种洗脱方式简单、条件温和，不会影响待分离物质的活性，但洗脱体积一般比较大，得到的待分离物质浓度较低。当待分离物质和配体结合较强时，可以通过选择适当的 pH、离子强度等条件降低待分离物质与配体的亲和力，具体的条件需要在实验中摸索。选择梯度洗脱方式可以将亲和力不同的物质分开。如果希望得到较高浓度的待分离物质，可以选择酸性或碱性洗脱液，或有较高的离子强度的溶液进行一次快速洗脱，这样在较小的洗脱体积内就能将待分离物质洗脱出来。选择洗脱液的 pH、离子强度时应注意尽量不影响待分离物质的活性，而且洗脱后应注意中和酸碱，透析去除离子，以免待分离物质丧失活性。待分离物质与配体结合非常牢固时，可以使用较强的酸、碱或在洗脱液中加入脲、胍等变性剂使蛋白质等待分离物质变性而从配体上解离出来，然后再通过适当的方法使待分离物质恢复活性。

3.4.7　变性高效液相色谱

变性高效液相色谱（denaturing high performance liquid chromatography，DHPLC）又称为温度调控的杂合双链色谱（temperature modulated heteroduplex chromatography，TMHC），是一种新型的检测、高通量筛选 DNA 序列变异的 HPLC 技术[6~9]，主要是在适当的部分变性温度和洗脱条件下，通过离子对反相高效液相色谱技术，使不匹配的异源双链 DNA 与匹配的同源双链 DNA 得以分离和检测。该方法的特点是：快速分离 DNA 分子，一个样品进行基因突变检测只需大约 8.8min；操作自动化；可准确测定 DNA 片段大小；基因突变检出率高达 95%～100%；经济、操作简便、PCR 产物无需进行纯化处理即可用于突变检测。目前这项技术已广泛应用于基因突变检测、单核苷酸多态性分析（SNP）和短片段串联重复序列分析（STR）。

1. DHPLC 进行基因突变检测的原理

DHPLC 是通过反相离子对色谱对 DNA 片段进行分离，即使用反相色谱固定

相，用含有表面活性剂三乙氨基乙酸（TEAA）的水溶液和乙腈/水溶液进行梯度洗脱。在色谱分离过程中，带正电荷的 TEAA 离子与带负电荷的 DNA 缔合为离子对，TEAA/DNA 离子对通过 TEAA 分子中的烷基链在固定相上产生保留。DNA 片段越长，所带负电荷越多，与之结合的 TEAA 分子就越多，与固定相的亲和力就越强。所以，在不变性温度条件下，可分离长度不同的纯合双链 DNA 分子。

DHPLC 进行基因突变检测是基于异源双链的形成[10,11]。一个杂合子个体的 PCR 产物一定含有野生型和突变型两种 DNA，并且两者的比例为 1∶1，因此，在 PCR 产物进行变性复性的过程中，杂交会形成同源双链和异源双链。同样，当把野生型和突变型 PCR 产物混合进行变性复性过程，杂交后会出现 4 种情况，它们不仅形成同源双链，同时也错配形成异源双链，见图 3.11(a)。异源双链由于碱基对不匹配，在部分变性的温度条件下，就会在不匹配的碱基对处部分解链，由于单链 DNA 带负电荷少，结合力弱，因此，异源双链比同源双链先被洗脱出来，根据色谱柱保留时间的不同，使同源双链和异源双链得到分离，见图 3.11(b)、(c)。又由于 DNA 分子中不同碱基对的热稳定性不同，即按照 GC、AT、GT、AC 的次序依次降低，所以，在某一特定变性温度下，碱基对按照 AC、GT、AT、GC 的次序先后被洗脱下来。

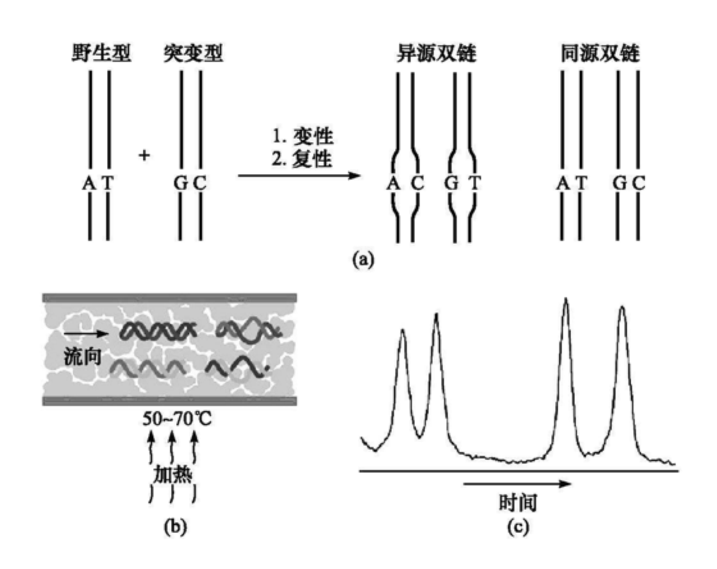


图 3.11　部分变性检测基因突变的原理

(a) 用 PCR 法扩增来自至少两种染色体（野生型和突变型）的含有 200～1000 bp 的 DNA 片段，PCR 扩增产物于 95℃变性 3 min，复性≥30 min，使温度降至 65℃，由此获得同源双链和错配形成的异源双链；(b) HPLC 分离，根据野生型 DNA 的 T_m 值确定适当的柱温，以保持被分离物处于部分变性的状态，一般为 50～70℃；(c) 异源双链在柱上的保留能力较同源双链弱，被先洗脱

2. DHPLC进行基因突变检测的基本方式

(1) 已知野生型:直接进行检测,在不变性和部分变性温度条件下,均为单一峰。

(2) 已知杂合子变异型:不需与野生型进行混合,经过变性复性过程,在部分变性温度条件下,色谱峰的个数和峰的对称性改变,与野生型比较进行鉴别。

(3) 已知纯合子变异型:需与野生型进行混合,经过变性复性过程,在部分变性温度条件下,色谱峰的个数和峰的对称性改变,与野生型比较进行鉴别。

(4) 未知样品:需与野生型进行混合,经过变性复性过程,在部分变性温度条件下,若有突变,则色谱峰的个数和峰的对称性改变,与野生型比较进行鉴别;若没有突变,则为单一峰。

3. 影响DHPLC检测结果的主要因素

1) PCR产物的影响

PCR扩增为高通量筛检SNP提供了标本源。DHPLC对PCR中的引物、试剂虽无特殊要求,而且也不必对PCR产物进行预处理,但是要尽量保证PCR扩增产物的忠实性,避免人为引入错配碱基。

2) 洗脱温度

温度是影响DHPLC检测SNP成功与否的重要因素,进行突变检测时,色谱柱温的选择与野生型DNA融解温度 T_m 值有关。T_m 是指半数双链DNA分子解链时的温度,部分变性是在DNA融解温度 T_m 附近的温度下进行的,计算机软件可根据DNA序列预测 T_m 值,一般在 T_m 值上下2℃范围内进行检测。如将检测温度提高2℃后,就可在RET基因中发现两个漏检的SNP。有些SNP对温度不敏感,在较宽的温度范围内(悬殊8℃左右)都可对其进行有效筛检;但有的SNP对温度就要求严一些,如BRCAl基因的56134C/T与2640C/T只有分别在59℃与57℃下,才能被检测到。

3) 固定相

目前,有几种不同的分离介质被用于DHPLC分析。如美国Transgenomic公司应用大小为2μm的无孔聚苯乙烯颗粒作为分离柱的介质,惠普公司则使用孔径为3.5μm的硅胶作为分离柱介质。这两种柱的分辨率近乎相似,但寿命却大不相同。前者通常可分析6000个左右的样品,而后者仅可分析1000～2000个样品。最近,瓦里安公司(Walnut Creek,CA)开发出多聚物包被的碱性化硅胶柱。也有

公司尝试将无孔聚苯乙烯与有孔硅胶结合，制成单片集成毛细管柱，可使柱效提高40％。

4）流动相

流动相中离子对试剂TEAA的浓度对DHPLC分析的温度有显著影响。如果TEAA的浓度从100 $mmol \cdot L^{-1}$升高至200 $mmol \cdot L^{-1}$，那么对应的最佳检测温度就要提高4～4.5℃。流动相的pH(pH6～9)对检测效果几乎没有任何影响，但pH太高将会使双链DNA完全变性，达不到检测目的；pH太低又会干扰DNA与TEAA的相互作用，影响检测效果。

4. 变性高效液相色谱仪

与分析型的高效液相色谱仪相比，变性高效液相色谱仪是在其基础上增加了对进样器和色谱柱箱温度的精密控制，恒温自动进样器的温度控制范围为4～40℃，可设定1℃。柱温箱温度设定范围为室温下10～80℃，温度稳定性为±0.15℃。

实际上，一台变性高效液相色谱仪具有3种检测功能：

(1) 在部分变性的温度条件下，突变型和野生型的PCR产物经过变性复性过程，不仅分别形成同源双链，同时也错配形成异源双链。根据柱子保留时间的不同可将同源双链和异源双链分离，从而识别突变型。根据这一原理，可进行基因突变检测、单核苷酸多态性分析(SNP)和短片段串联重复序列分析(STR)。

(2) 在充分变性温度条件下，单链DNA和RNA分子能被区分，适用于对长度为50～100 mer的短链核苷酸合成纯度的分析和质量控制。此时，柱温应大于70℃，以保证被测定成分充分变性[12]。

(3) 在不变性温度条件下，色谱仪类似凝胶电泳仪，可分离相对分子质量不同的双链DNA分子或分析具有长度多态性的片段，类似RFLP分析，也可进行定量RT-PCR及微卫星不稳定性测定(microsatellite instability，MSI)[13～16]。

3.5　整体色谱柱

整体色谱柱(monolithic column)又称为连续固定相(continuous-bed stationary phase)，是通过原位聚合和类似浇铸的方法，在色谱柱空柱管内形成整体、连续的柱体，而不需用细粒径填料去装填。它具有极好的通透性，柱容量大，能显著提高色谱分析速度(或在相同时间内有比填充柱更大的峰容量)，因此，适宜于蛋白质组、代谢物组以及药物及其代谢产物等复杂体系的高通量、大样本的分析。

3.5.1　整体色谱柱的基本结构特点

整体色谱柱是由一整块固体构成的柱子，由具有相互连接的骨架并提供流路通道的有机聚合物或硅胶凝胶整体组成。整体色谱柱的柱床可制成圆柱棒、圆盘片或极薄的功能膜等多种形式。目前，商品化整体色谱柱的内径已有 3mm、4.6mm、10 mm、25 mm 等规格，分别用于常规分析、半制备和制备色谱，内径 100 μm 的商品化整体色谱柱也已开发成功。整体色谱柱的基本结构特点是具有大的流通孔尺寸/骨架尺寸的比值，从而缩短了溶质在柱内的扩散途径，减小了传质阻抗，大大增加了柱的渗透率。以溶胶凝胶法制备的硅胶整体色谱柱有两种孔结构，即微米级的通孔（throughpore or macropore）和纳米级的中孔（mesopore），见图 3.12。两种孔结构既保证了流动相的流通又便于样品分子进入，因此，即使采用较高流速，也不会出现太高的柱压，从而可缩短分析时间。

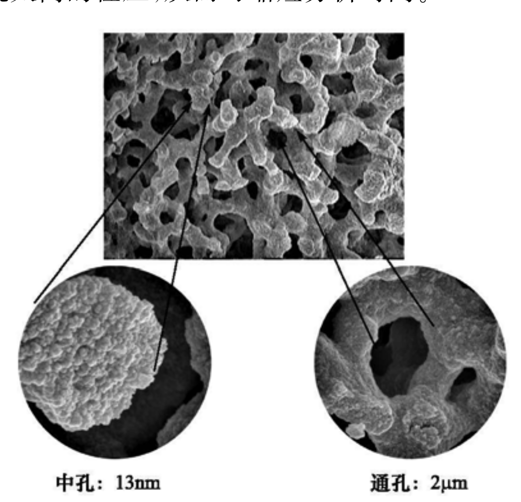


图 3.12　一种硅胶整体柱柱床的扫描电镜图

3.5.2　整体色谱柱的种类

整体色谱柱通常由有机聚合物凝胶或无机硅胶凝胶组成。

1. 聚合物整体柱

目前使用的聚合物主要是聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸甲酯和衍生的聚苯乙烯。整体柱的总孔度（通孔和中孔的总和）达到 60%～70%。聚合物整体柱可用于蛋白质、多肽、核酸等生物大分子的高效、快速分离，但用于生物小分子的分离时，这些分子在中孔中的质量传递较慢，分离效率不高。

2. 硅胶整体柱

它使用四甲基硅氧烷[$Si(OCH_3)_4$，TMOS]或四乙基硅氧烷[$Si(OC_2H_5)_4$，TEOS]作原料，在醇、水存在的条件下，加入强酸保持 pH 在 2～3，使 TMOS(或 TEOS)发生水解反应和缩聚反应，SiO_2 相分离析出形成溶胶，经转化形成凝胶，再通过陈化、溶剂交换、干燥和热处理使其固化，经表面改性(如烷基化等)制成柱床。最后用聚四氟乙烯(PTFE)或聚醚酮(PEEK)包覆，或预浇铸于柱管中形成整体柱。此过程也可在熔融硅毛细管柱中直接制成毛细管整体柱用于微柱液相色谱分析[17～19]。

与常规微粒填充柱比较，硅胶整体柱具有连续多孔网状结构。在模具中浇铸的整体柱，其流通孔尺寸/骨架尺寸的比值为 1.2～1.5；在熔融硅毛细管中制作的整体柱，此比值为 3～5；而一般微粒填充柱，此比值仅为 0.25～0.4。因此，它具有相对大的流路通道，其柱压力可减小至具有相似柱效的微粒填充柱的 1/10，表明硅胶整体柱有更好的柱渗透性。当使用常规 HPLC 设备在高线速下工作时，其柱效将提高 10 倍。在用硅胶整体柱 Chromolith® Performance RP-18e 分离 5 种 β 肾上腺受体阻断剂的色谱图中，流速增加到 9 ml • min^{-1} 时，柱压仅为 15.3MPa，5 种成分在 1.5min 之内实现了基线分离，见图 3.13。

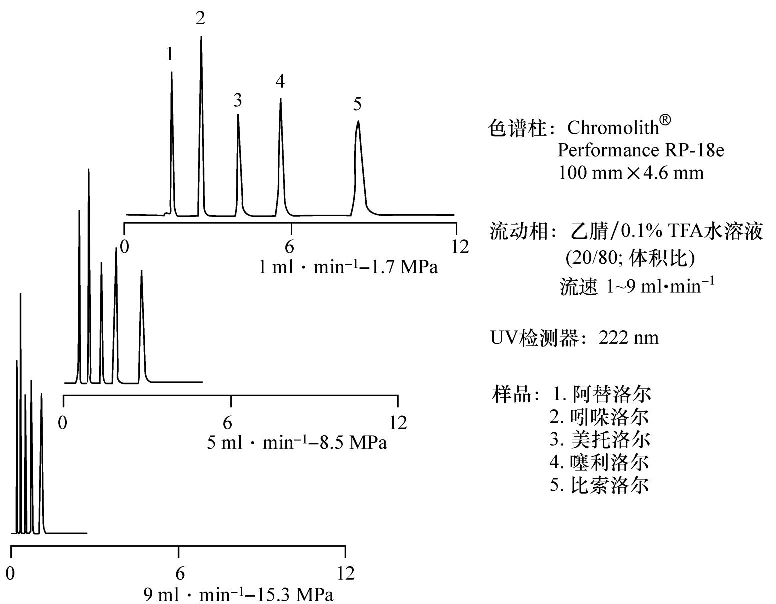


图 3.13　硅胶整体柱在三种流速下分离 β 肾上腺受体阻断剂的色谱图[19]

硅胶整体柱与聚合物整体柱比较，具有更高的机械强度，且在与有机溶剂接触过程中不发生溶胀，因此，近年来在蛋白质、多肽、核酸、药物及其代谢物、对映异构

体的分离分析中获得愈来愈多的应用。

综上所述,整体色谱柱的突出的优点是:

(1) 不需要专用的配套仪器,使用常规的 HPLC 设备,以简单的压力驱动,就可实现优于微粒填充柱的色谱分离效果。

(2) 整体色谱柱特殊的孔结构使之具有比微粒填充柱好得多的柱通透性。在使用微粒填充柱的分析型 HPLC 中,由于输液泵的操作压力限定在 35～40 MPa,因此若用 1～3 μm 的柱填料时,只能使用 3～5 cm 的短色谱柱,工作流速为 1 $ml \cdot min^{-1}$。整体色谱柱的工作流速可以提高到 10 $ml \cdot min^{-1}$,商品分析柱的柱长为 2.5～10 cm,还可以用柱连接管(column coupler)将多个整体色谱柱串联使用。目前已有使用一米长的柱子实现分离的报道[19]。

(3) 易于制备,固定相的改性和功能化可在一次聚合或浇铸过程中完成。其工艺方法不仅可用于制作常规 LC 柱、毛细管柱,也可用于制备柱的制作。

(4) 可在化学聚合的过程中控制孔径的大小,通孔可在 1～3 μm、中孔可在 10～25 nm 的范围调节,比表面积约为 300 $m^2 \cdot g^{-1}$。这些性能使其在生物大分子的分离分析上有明显的优势。

但是,与微粒填充柱有大量可选择的商品化柱相比,整体柱的种类还比较单一,只有 C18、C8、硅胶等几种,尚不能满足各种分析工作的需要。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会.中国药典(二部).北京:化学工业出版社,2005.附录 29

[2] Waters. ACQUITY Ultra Performance LC™. 2004

[3] Mellors J S, Jorgensen J W. *Anal. Chem*. 2004, **76**: 5441

[4] Patel K D, Jerkovich A D, Link J C et al. *Anal. Chem*. 2004, **76**: 5777

[5] Kirkland J J, Truszkowski F A, Ricker R D. *J. Chromatogr. A*. 2002, **965**: 24

[6] Gross E, Arnold N, Goette J et al. *Human Genetics*. 1999, **105**: 72278

[7] Spiegelman J I, Mindrinos M N, Oefner P J. *Biotechniques*. 2000, **29**: 1084

[8] Wolford J K, Blunt D, Ballecer C et al. *Human Genetics*. 2000, **107**: 483

[9] Oefner P J, Underhill P A. *Am. J. Human Genetics*. 1995, **57**: A266

[10] O'Donovan M C, Oefner P J, Roberts S C et al. *Genomics*. 1998, **52**: 44

[11] Gross E, Arnold N, Pfeifer K et al. *Human Mutation*. 2000, **16**: 345

[12] Oefner P J. *J. Chromatogr. B* 2000, **739**: 345

[13] Xiao W, Oefner P J. *Human Mutation*. 2001, **17**: 439

[14] Holinski-Feder E, Muller-Koch Y, Friedl W et al. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2001, **47**: 21

[15] Wu G, Wu W, Hegde M et al. *Genetic Testing*. 2001, **5**: 281

[16] 罗怀容, 施鹏, 张亚平. 遗传. 2001, **23**: 471

[17] Tanaka N, Kobayashi H, Nakanishi K et al. *Anal. Chem*. 2001, **73**: 421A

[18] Tanaka N, Kobayashi H, Ishizuka N et al. *J. Chromatogr. A*. 2002, **965**: 35

[19] MERCK:Speed and Performance in Monolithic Form. Chromolith® HPLC Columns

第 4 章　电 泳 技 术

带电颗粒在电场的作用下向着与其电性相反的电极方向迁移，这种现象称为电泳(electrophoresis，EP)。许多重要的生物分子(如氨基酸、多肽、蛋白质、核酸等)都具有可电离基团，在特定的 pH 溶液中它们可以带正电或负电，在电场的作用下，这些带电离子会向着与其所带电荷极性相反的电极方向移动。电泳技术就是利用在电场的作用下，由于待分离样品中各种分子带电性质以及分子本身大小、形状等性质的差异，使带电分子产生不同的迁移速度，从而对样品进行分离、鉴定或提纯的技术。

1809 年，俄国物理学家 Рейсе 首次发现电泳现象。1909 年，Michaelis 首次将胶体离子在电场中的移动称为电泳。电泳作为一种分离技术是在 1937 年由瑞典 Uppsala 大学的 Tiselius 建立了“移界电泳”以后才实现的。他创造了 Tiselius 电泳仪，使用光学方法观察到了在电泳迁移过程中血清蛋白质界面的移动，并首次证明了血清是由白蛋白及 α、β、γ 球蛋白组成的。由于 Tiselius 在电泳技术方面做出的开拓性贡献，使他获得了 1948 年的诺贝尔化学奖。电泳早期的支持介质主要是以薄膜、薄层为主。1948 年，Wieland 和 Fischer 重新发展了以滤纸作为支持介质的电泳方法，对氨基酸的分离进行了研究。1950 年，Durrum 用纸电泳进行了各种蛋白质的分离以后，开创了利用各种固体物质(如各种滤纸、乙酸纤维素薄膜、琼脂凝胶、淀粉凝胶等)作为支持介质的区带电泳方法。1959 年，Raymond 和 Weintraub 利用人工合成的凝胶作为支持介质，创建了聚丙烯酰胺凝胶区带电泳方法，极大地提高了电泳技术的分辨率。1960 年以后，Orenstein 和 Davis 从理论上阐述了聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis，PAGE)，并通过改进实验方法使得凝胶电泳技术得以推广应用。1967 年，Shapiro 等在此基础上首先建立了 SDS-PAGE 技术，随后 Weber 和 Osborn 对其进行了完善。20 世纪 70 年代以后根据不同需要又发展了等电聚焦电泳、双向电泳、印迹转移电泳等技术。电泳的模式也从圆盘电泳、垂直板电泳、脉冲电泳等发展到后来的分辨率极高的毛细管电泳。电泳后的检测手段也从染色、扫描等方法延伸到紫外吸收、放射自显影、生物活性测定、化学发光、荧光激发以及质谱和核磁共振等方法，以进行分析并得到所需数据。可以说，近代电泳技术仍是生物化学和分子生物学中对生物大分子使用最普遍、分辨率最高的分析鉴定技术之一。

4.1　电泳的基本原理

生物大分子由于其本身的解离或表面吸附其他带电质点而带电，带电粒子在电场中运动，不仅是物质的一种运动现象，还是一种有效的物质分离方法。各种带电粒子在电场中移动方向取决于它们的带电符号，而移动的速度不同形成各自特定的迁移率。迁移率大小不仅取决于粒子自身特性，还取决于外部多种因素。

4.1.1　电泳迁移率

电泳迁移率(electophoretic mobility)对于一个特定的生物分子是一个恒定的常数，它决定着粒子在电场中的移动速度。如果把带有效电荷 q 的生物大分子的胶体溶液放在没有干扰的电场强度为 E 的电场中，使该粒子具有恒定迁移率的动力 F_{ef} 等于该粒子所带净电荷与电场强度的乘积：

$$F_{ef} = q \cdot E \tag{4.1}$$

这个作用力使得带电粒子向与其电荷相反的电极方向移动。在移动过程中，粒子会受到介质摩擦力的阻碍。摩擦力(F_{fr})的大小与粒子大小、形状、电泳介质孔径大小以及缓冲液黏度等有关，并与带电粒子的移动速度成正比。对于球形粒子来说，在自由溶液中此阻力的大小服从 Stokes 定律：

$$F_{fr} = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \tag{4.2}$$

式中，r 是球状分子的半径；η 是缓冲液黏度；v 是带电粒子的移动速度($v = d/t$，单位时间粒子运动的距离，$cm \cdot s^{-1}$)。但在凝胶中，这种阻力并不完全符合 Stokes 定律。F_{fr} 还取决于介质中的其他因素，如凝胶厚度、颗粒大小和介质的内渗等。

当带电颗粒达到稳态运动时，两种作用力相等，即：

$$F_{ef} = F_{fr} \tag{4.3}$$

由式(4.1)、(4.2)、(4.3)即可得出：

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \tag{4.4}$$

电泳迁移率(μ)是指在单位电场强度($1\ V \cdot cm^{-1}$)时带电粒子的迁移速度：

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \tag{4.5}$$

由式(4.5)可以看出，迁移率与带电分子所带净电荷成正比，与分子的大小和缓冲液的黏度成反比。在确定条件下，某物质的迁移率为常数，是该物质的物理化学特性常数，从式(4.5)中可以导出迁移率的单位是 $cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$。带电颗粒迁移率的差异提供了从混合物中分离各种物质的基础，迁移距离与迁移率成正比。

4.1.2　焦耳热

在电泳过程中，电流通过导电介质时，由于有电阻的存在会产生欧姆热，也就是焦耳热(joule heating)。这种热量必须通过介质(如凝胶或毛细管的表面)散发出去，因此，在介质中会形成一个温度梯度，这将直接导致电极间形成对流，从而产生泳带扩散或分辨率下降的现象。释放出的热量(Q)与电流强度(I)的关系可列成如下公式：

$$Q = I^2 \cdot R \cdot t \tag{4.6}$$

式中，R 为电阻；t 为电泳时间；I 为电流强度。公式表明，电泳过程中释放出的热量与电流强度的平方成正比。当电场强度或电极缓冲液中离子强度增高时，电流强度会随着增大，这不仅会降低分辨率，而且在严重时会熔化支持物(如琼脂糖凝胶)。降低焦耳热的方法有：①尽量使用较低的电场强度或降低电泳缓冲液的离子强度，当然，电泳中过低的电压会导致延长电泳时间和降低分离效率；②尽量使用薄胶或直径较小的毛细管，这样会加快散热。由于此时的电阻较高，根据欧姆定律，如果电压不变，则电流减小，因此，导致焦耳热减小。但这样做同时也减少了样品的上样量，也就降低了电泳的检测限。

4.1.3　电渗流

当支持物(琼脂、凝胶、毛细管)不是绝对惰性物质时，常常会因支持物上存在负离子基团(如羧基、羟基、硅醇基等)吸附电极溶液中的正离子(如 H^+)，形成一个正离子层。在电场作用下，此溶液层会向负极移动；反之，溶液层会向正极移动。电场中溶液层的这种泳动称为电渗流(electroosmotic flow, EOF)，这种现象也称为电渗(electroosmosis)现象，溶液层所受到的电场力称为电渗力(图 4.1)。当带电颗粒的泳动方向与电渗方向一致时，则加快颗粒的泳动速度；当颗粒的泳动方向与电渗方向相反时，则降低颗粒的泳动速度。当电场力等于或小于电渗力时，则颗粒的泳动速度为零或向相反的方向移动。

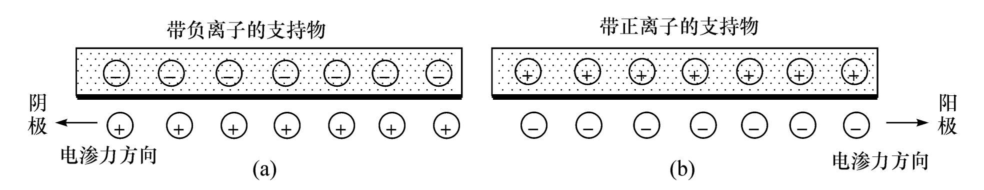


图 4.1　电渗示意图

电渗流是毛细管电泳设计的重要理论依据之一，石英毛细管壁上的硅烷基，在 pH＞4 时就会带负电荷，吸附溶液中的带正电荷离子，这种吸附能力从毛细管表

面到中心逐渐减弱形成 zate 电势(ζ)。电势的大小与溶液的离子强度正相关。毛细管中电渗流的速度(v_{eof})与溶液的电势(ζ)、电介常数(ε)和电场强度(E)成正比,与溶液的黏度(η)成反比,即

$$v_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \tag{4.7}$$

电渗迁移率(μ_{eof})定义为单位电场强度中溶液在电渗力的作用下的迁移速度:

$$\mu_{eof} = \frac{v_{eof}}{E} \tag{4.8}$$

在毛细管中电泳时,电渗流可以通过以下方式控制:①在低 pH 下电泳;②进行化学表面修饰;③对毛细管壁进行动态涂层;④使用添加剂改变溶液的黏度或电势。

当 pH 低到可以使硅烷基团质子化时,毛细管表面电荷被中和,通常这种情况都是发生在 pH<4 时。此时,多数生物分子不够稳定,硅烷基团的化学修饰可以使毛细管壁处在非常亲水或非常疏水状态。通过磺酸处理形成的亲水表面可以保持恒定的高电渗流,而挂上疏水基团的表面就可以抑制电渗流。这种方法的不足之处是化学修饰的长期稳定性较差。另一种选择是在电泳缓冲液中加入聚乙二醇,动态的在毛细管壁上形成黏液层,封闭管壁上的电荷,从而抑制电渗流。一些中性的添加剂(如羟乙基纤维素、聚乙烯醇)可以增加电泳缓冲液的黏度,减小电渗流的速度,抑制离子与毛细管表面的相互作用。而一些有机溶剂(如甲醇或乙腈)也可以用来降低或增加溶液的黏度。此外,像十二烷基三甲基溴化铵(dodecyl trimethyl ammonium bromide,DoTAB)这类阳离子表面活性剂可以吸附在毛细管壁上改变表面电性,从而改变电渗流的方向。当然,表面活性剂必须在较低的浓度下使用才能避免形成束胶干扰样品分离。

4.1.4　分离效率与分辨率

电泳的分离效率(separation efficiency)与分辨率(resolution)受各待分离物质的电泳流和电渗流的共同影响,即影响电泳迁移率的因素决定着分离效率与分辨率。电泳的分辨率指的是两个离子之间的分离效率,分辨率(RS)的好坏取决于离子迁移率间的差值($\Delta\mu_{ep}$)、扩散系数(D)和电泳的分离电压(V),即

$$\mathrm{RS} = \Delta\mu_{ep} \cdot \sqrt{V} \cdot \sqrt{\frac{1}{\mu_{app}}} \cdot \frac{1}{4 \cdot \sqrt{2 \cdot D}} \tag{4.9}$$

最好的优化分辨率的方法是提高分离效率,即增加离子间迁移率的差值。这可以通过改变缓冲液的 pH 或改变电泳模式来实现。此外,对于具有低扩散系数的大分子分辨率较高。由电泳迁移率的公式可以看出,影响电泳分离的因素很多,

主要的影响因素如下所述。

1. 生物大分子的性质

待分离生物大分子所带的静电荷量、分子直径与形状都会对泳动速度有明显影响。一般来说，分子带的电荷量越大，直径越小，或其形状越接近球形，则其电泳迁移速度越快。

2. 电泳缓冲液的性质

缓冲液的pH会影响待分离生物大分子的解离程度，从而决定其带静电荷的量。溶液pH距离其等电点越远，所带净电荷量就越大，电泳的速率也就越快。对于蛋白质、核酸等两性分子，缓冲液pH还会影响到其电泳方向，当缓冲液pH大于分子的等电点，则分子带负电荷，其电泳的方向是流向正极，反之则流向负极。为了保持电泳过程中待分离生物大分子的带电荷量以及缓冲液pH的稳定性，缓冲液必须保持一定的离子强度，一般在0.02～0.2。离子强度过低，则缓冲能力差，但如果离子强度过高，会在待分离分子周围形成较强的带相反电荷的离子扩散层——离子氛(ionic atmosphere)，由于离子扩散层与待分离分子的移动方向相反，产生静电引力，因而引起电泳速率降低。离子的这种障碍效应与其浓度和化合价数相关，可用离子强度(I)表示：

$$I = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{s} C_i Z_i^2 \tag{4.10}$$

式中，s表示溶液中离子种类；C_i 和 Z_i 分别表示每种离子的摩尔浓度与化合价。

另外，缓冲液的黏度也会对电泳速率产生影响。由于黏度与电泳速率成反比关系，因此，黏度过大或过小都会影响分子的迁移率。

3. 电场强度

电场强度($V \cdot cm^{-1}$)是每厘米的电位降，也称电位梯度。电场强度越大，电泳速率越快。但增大电场强度会引起通过介质的电流强度增大，造成电泳过程产生的热量增大。

电流所做的功绝大部分都转换为焦耳热，因而引起介质温度升高，这会导致以下结果：样品和缓冲离子扩散速率增加，引起样品分离带的加宽；产生对流现象，引起待分离物的再混合；对热敏感样品，引起样品变性；引起溶液黏度降低、电阻下降，严重时会损坏仪器。

电泳中产生的热通常是由中心向外周扩散，一般支持物中心温度要高于外周，尤其是管状电泳，由此引起中央部分介质相对于外周部分黏度下降，摩擦系数减小，样品电泳迁移速率增大，相同离子在中央部分的电泳速率比边缘快，导致电泳

分离带呈弓形。降低电流强度,可以减小产热,但会延长电泳时间,引起离子扩散增加从而影响分离效果。所以,电泳实验中要选择适当的电场强度,条件允许时可以适当冷却以降低温度来获得较好的分离效果。

4. 电渗

液体在电场中,对于固体支持介质的相对移动,称为电渗现象。如果电渗方向与待分离生物大分子电泳方向相同,则加快电泳速度;如果相反,则降低电泳速度。这是因为待分离样品的实际迁移率(μ_{app})为电泳迁移率(μ_{ep})和电渗迁移率(μ_{eof})的矢量和,即

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eof} \tag{4.11}$$

5. 支持物的筛孔

支持物的筛孔大小对待分离生物大分子的电泳迁移速率有明显的影响。在筛孔大的介质中,泳动速率快,反之,则泳动速率慢。

4.1.5 电泳的分类

(1) 电泳按分离原理分类,可分为如下几类:①区带电泳(zone electrophoresis, ZEP)。在均一的缓冲液系统中电泳,待分离的各组分分子在支持介质中被分离成许多条独立的区带,可用染色等方法显示出来,这是当前应用最为广泛的电泳技术。②移界电泳(moving boundary electrophoresis, MBEP)。这是瑞典 Uppsala 大学的著名科学家 Tiselius 最早建立的电泳技术,在 U 形管中进行电泳,无支持介质,把电场加在生物大分子溶液和缓冲液之间的界面上,带电离子的移动速度通过光学方法观察界面的移动来测定,能起到部分分离作用,但分离组分有相互重叠的部分,分离效果差,现已被其他电泳技术所取代。③稳态电泳(steady state electrophoresis)。带电颗粒在电场作用下电迁移一定时间后达到一个稳定状态,此后,电泳条带的宽度不随时间的变化而变化。如等速电泳(isotachophoresis, ITP),使用专用电泳仪,当电泳达到平衡后,各电泳区带分成清晰的界面,并以等速向前运动;等电聚焦电泳(isoelectric focusing, IEF),两性电解质在电场中自动形成 pH 梯度,当被分离的生物大分子移动到各自等电点的 pH 处即聚集成很窄的区带。④显微电泳(microelectrophoresis)。是用显微镜直接观察细胞等大颗粒物质的电泳行为过程。目前,此法已用于研究细胞膜结构以及肿瘤细胞和正常细胞的差异性等方面。

(2) 按支持介质的不同分类:有纸电泳(paper electrophorisis)、乙酸纤维薄膜电泳(cellulose acetate electrophoresis)、琼脂凝胶电泳(agar gel electrophoresis)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis,PAGE)、SDS-聚丙烯酰

胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

(3) 按支持介质形状不同分类:有薄层电泳、板电泳、柱电泳、毛细管电泳。

(4) 按用途分类:有分析电泳、制备电泳、定量免疫电泳、连续制备电泳。

(5) 按所用电压分类:①常压电泳,100～500V,电泳时间较长,适于分离蛋白质等生物大分子,多用于凝胶电泳;②高压电泳,1000～5000V,电泳时间短,有时只需几分钟,多用于氨基酸、多肽、核苷酸和糖类等小分子物质的分离,用于等电聚焦电泳和 DNA 测序;③超高压电泳,30 000～50 000V,用于毛细管电泳。

电泳技术所涉及的主要设备是电泳仪和电泳槽,随着技术的发展,电泳技术的种类逐渐增加,凝胶电泳在制胶、电泳系统的冷却、凝胶染色及结果分析等方面的手段日趋完善,发展出一系列的附属设备。例如:外循环恒温系统、梯度混合仪、脱色仪、干胶仪、凝胶扫描仪和凝胶成像系统等。

在现代分子生物学实验中,最常用的技术是通过凝胶电泳进行核酸片段的分离。而后基因组计划中的蛋白质组学研究,则利用凝胶 2-D 电泳技术来分离蛋白质分子。电泳所使用的介质主要是聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶,电泳的方式可分为垂直型和水平型。一般来说,聚丙烯酰胺凝胶电泳用来分离较短的核酸片段(5～500bp)和蛋白质,分辨率高于琼脂糖凝胶电泳,而后者主要用于分离 0.1～60kb 的较大核酸片段。

4.2　琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳(agar gel electrophoresis)是用琼脂糖作支持介质的一种电泳技术,使用水平电泳槽。琼脂糖是从琼脂中提纯出来的,主要由 D-半乳糖和 3,6-脱水 L-半乳糖连接而成的一种线性多糖。琼脂糖之间以分子内和分子间氢键形成较为稳定的交联结构,这种交联的结构使琼脂糖凝胶有较好的抗对流性质。琼脂糖凝胶的孔径可以通过琼脂糖的最初浓度来控制,低浓度的琼脂糖形成较大的孔径,高浓度的琼脂糖形成较小的孔径,一般使用的浓度范围为 0.3%～2.0%。尽管琼脂糖本身没有电荷,但一些糖基可能会被羧基、甲氧基,特别是硫酸根等不同程度地取代,使得琼脂糖凝胶表面带有一定的电荷,引起电泳过程中发生电渗以及样品和凝胶间的静电相互作用,影响分离效果。市售的琼脂糖有不同的提纯等级,主要以硫酸根的含量为指标,硫酸根的含量越少,提纯等级越高。

琼脂糖凝胶可以用于蛋白质和核酸的电泳支持介质,尤其适合于核酸的提纯、分析。如浓度为 1%的琼脂糖凝胶的孔径对于蛋白质来说是比较大的,对蛋白质的阻碍作用较小,这时蛋白质分子大小对电泳迁移率的影响相对较小,所以适用于一些忽略蛋白质大小而只根据蛋白质天然电荷来进行分离的电泳技术,如免疫电泳、平板等电聚焦电泳等。琼脂糖电泳通常用于线性 DNA、RNA 分子的分离、分

析，因为电泳迁移率与DNA分子质量密切相关，而与碱基排列及组成无关。分离核酸的范围与琼脂糖浓度有关，如表4.1所示。此外，一些细菌的开环或闭环DNA也可以用此法分离分析。在进行核酸类物质分离、鉴定时，使用较纯的无电渗力的琼脂糖为宜，而在实施制备回收时，则选择低熔点的琼脂糖较好。原因是前者熔点为80～90℃，此温度会导致双链DNA解链，后者熔点小于65℃，30℃即可形成凝胶，不会破坏天然的DNA结构。

表4.1 琼脂糖浓度及其分离核酸的范围

琼脂糖凝胶/(% $m\cdot V^{-1}$)	线性DNA的分离范围/kb	琼脂糖凝胶/(% $m\cdot V^{-1}$)	线性DNA的分离范围/kb
0.3	50～60	1.2	0.4～6.0
0.6	1～20	1.5	0.2～4.0
0.7	0.8～10	2.0	0.1～3.0
0.9	0.5～7.0	—	—

琼脂糖凝胶的操作与注意事项如下：

1. 缓冲溶液的配制

琼脂糖凝胶电泳常用的缓冲液如表4.2所示。在分离核酸电泳时，制胶缓冲液与电泳槽中的缓冲液相同，且正负两极缓冲液要不断循环混合。通常多选用Tris-硼酸缓冲体系(TBE)，因为其缓冲能力强，也有选用Tris-磷酸、Tris-乙酸缓冲体系(TEA)的。较少使用Tris-盐酸缓冲体系，除了因盐酸中氯离子的泳动速度快于样品，造成电泳条带不均衡外，还因其可能生成次氯酸盐而影响样品分离。

表4.2 琼脂糖凝胶电泳常用的缓冲液

浓度	缓冲液	pH
1.50 $mmol\cdot L^{-1}$	Tris-NaH_2PO_4-1～5 $mmol\cdot L^{-1}$EDTA	7.5～8.0
2.50 $mmol\cdot L^{-1}$	Na_2HPO_4-NaH_2PO_4-1～5 $mmol\cdot L^{-1}$EDTA	7.5～8.0
3.50 $mmol\cdot L^{-1}$	Tris-乙酸-1～5 $mmol\cdot L^{-1}$EDTA(TEA)	7.5～8.0
4.50 $mmol\cdot L^{-1}$	乙酸钠-乙酸-1～5 $mmol\cdot L^{-1}$EDTA	7.5～8.0
5.89 $mmol\cdot L^{-1}$	Tris-H_3BO_3-1～5 $mmol\cdot L^{-1}$EDTA Na_2(TBE)	8.3

在配制缓冲液时，不论哪一种都需要加入适量的EDTA，以除去二价金属离子。另外，TBE虽比TEA有着更好的缓冲能力，但硼酸与琼脂糖易形成复合物，使凝胶带负电荷，可能会吸附带正电荷的物质。电泳时使用新制的缓冲液可以明显提高电泳效果。注意电泳缓冲液多次使用后，离子强度降低，pH上升，缓冲性能下降，可能使DNA电泳产生条带模糊或不规则的DNA带迁移的现象。

2. 琼脂糖凝胶制备

取琼脂糖盛入玻璃瓶中，按所需的凝胶浓度加入电泳缓冲液，溶化，待溶液冷

却到 60℃左右，先加入溴化乙锭溶液，使其终浓度达到 0.5μg · ml^{-1}，摇匀后即可加入封闭好的长方形模具中，室温放置 30～40min，凝固后即制成琼脂糖凝胶。凝胶的厚度一般为 3mm。

注意正确选择凝胶浓度很重要，浓度通常在 0.3%～2%之间，低浓度的用来进行大片段核酸的电泳，高浓度的用来进行小片段分析。低浓度胶易碎，小心操作和使用质量好的琼脂糖是解决办法。应注意高浓度的胶可能使分子大小相近的 DNA 带不易分辨，造成条带缺失现象。

3. 样品的配制

将制好的琼脂糖凝胶平移至水平式电泳槽中，注入缓冲液至高于胶面即可，接通电源，在负极端的加样孔中加核酸样品，一般为 25～50μl，最高可加 200μl。由于没有浓缩胶，样品应事先浓缩，同时在上样缓冲液中加指示剂和增加样品比重的物质，如蔗糖、聚蔗糖 400 或甘油。样品缓冲液配制参见表 4.3。

表 4.3　几种核酸电泳样品缓冲液配制(包括指示剂)

编号	缓冲液(×6)配方(样品液∶缓冲液=5∶1)
1	0.25%溴酚蓝-0.25%二甲苯腈 FF-40%(m · V^{-1})蔗糖水溶液(4℃)
2	0.25%溴酚蓝-0.25%二甲苯腈 FF-15%(m · V^{-1})蔗糖水溶液(室温)
3	0.25%溴酚蓝-0.25%二甲苯腈 FF-甘油水溶液(4℃，注：不适于硼酸缓冲液，甘油可促使硼酸解离，导致 pH 改变)
4	0.25%溴酚蓝-40%(m · V^{-1})蔗糖水溶液
5	30 mmol · L^{-1} NaOH-6 mmol · L^{-1}EDTA-18%(m · V^{-1})聚蔗糖(400 型)-0.25%溴甲酚绿-0.25%二甲苯腈 FF(适用碱性样品系统)

指示剂为有颜色的标记物，可指示样品的泳动过程。核酸电泳常用溴酚蓝(bromophenol blue，Bb)和二甲苯腈(xylene cyannol，Xc)，前者为蓝紫色，后者呈蓝色。溴酚蓝分子质量是 670Da，在不同浓度凝胶中的泳动速度相差不大。二甲苯腈分子质量是 554.6Da，因荷电量较少，泳动速度较溴酚蓝慢。在电泳过程中应根据样品片段的大小，参照指示剂的移动位置决定是否结束电泳。在实际应用时可参照表 4.4 进行选择和判断。

表 4.4　与指示剂相当的 DNA 大小与凝胶浓度的关系

琼脂糖凝胶浓度/%	二甲苯腈/bp	溴酚蓝/bp
1.0	2000	—
1.4	1600	200

在样品中加入增稠的物质是为了使样品集中于样品孔底部不致扩散，以保证

电泳条带的均匀、清晰。蔗糖(10%～15%)和甘油有时会导致电泳条带呈"U"形，此时可改用1%葡聚糖(ficoll)。

DNA电泳一定要使用DNA分子质量标准(Marker)或已知大小的对照DNA来估计DNA片段大小。Marker应该选择在目标片段大小附近，该处条带分布较密，这样对目标片段大小的估计才比较准确。需要注意的是Marker的电泳同样也要符合DNA电泳的操作标准。如果选择λDNA/HindIII或者λDNA/EcoRI的酶切Marker，需要预先65℃加热5 min，冰上冷却后使用，从而避免HindIII或EcoRI酶切造成的黏性接头导致的片段连接不规则或条带信号弱等现象。

4. 电泳

在加样前，有时需要预电泳1h左右，主要是为了除去介质中的杂质。在加样过程中应通较低的电压，随之电压可稍调高，当样品进入凝胶后使其维持在5～15V·cm^{-1}，一般为10 V·cm^{-1}即可。但对大片段的分离，电压更低些为好。有条件的电泳可在冷室中进行。注意如果电泳时电压和温度过高，可能导致出现条带模糊和不规则的DNA带迁移的现象，特别是电压太大可能导致小片段跑出胶而出现缺带现象。

5. 染色与观察

样品经电泳后形成的条带必须经染色才能被显示出来。核酸的染色剂常用的是溴化乙锭(thidium bromide,EB)，经其染色的凝胶在254 nm紫外灯下观察，存在核酸的部位呈红色荧光谱带，如果需要照相，应在相机镜头上加红色滤光片，以排除干扰。此外，还可使用吖啶橙(acridine orange，AO)、银(Ag^{+})试剂、亚甲蓝(methylene blue)等染色。不同的染色剂适用于不同的样品。

溴化乙锭作为一种荧光染料，其分子可以嵌入到核酸的碱基对之间，其之所以被广泛使用是由于它自身的许多优点。首先是操作简单，一般在凝胶或电泳缓冲液中加入终浓度为0.5 μg·ml^{-1} EB即可，也可以在电泳结束后将洗去缓冲液的凝胶直接浸泡在0.5 μg·ml^{-1} EB中30min即可，未洗干净的多余EB不影响观察。其次，EB染色不引起核酸断裂，其他染料很难做到这一点。另外，EB染色灵敏度较高，可以检测出10 ng的DNA样品。在需要时还可以用正丁醇提取来除去样品中的EB，被分离的核酸可以继续进行下游的研究工作，但这时应选择366 nm紫外线激发荧光以避免DNA损伤。使用中应注意的是，EB是强诱变剂，有中度毒性，应注意防护，如不慎与皮肤接触应立即用清水彻底冲洗。使用后的溶液应进行净化处理，使其至诱变活性低于原来的1/200左右后才能丢弃。

吖啶橙也是荧光染料，可嵌入到核酸的碱基对之间，在254 nm波长光下可被激发出530 nm的绿色荧光。吖啶橙还可以和单链核酸的磷酸结合，在254nm波

长光下被激发出 640 nm 的红色荧光。利用此原理可以区别单、双链核酸，灵敏度可以分别达到 0.1 μg 和 0.05 μg。但吖啶橙染色操作要求严格，染色结果与吖啶橙的浓度、pH、温度、离子浓度都有关系，故不容易掌握，使用频度并不高。

银染色方法在基因突变的筛选检测中经常使用，如：聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)，采用此法较为简单、可靠。它的阳性结果呈黑褐色，肉眼和图像分析系统均可以进行观察分析。该法操作简单，灵敏度是 EB 染色的 200 倍左右，但特异性差，除核酸外还可以和蛋白质、试剂中的去污剂等结合显色，干扰分析结果。另外，银离子显色与核酸的碱基组成有关，而与核酸含量不成正比，定量分析不准确，显色后的核酸不能进行回收。

亚甲蓝可以用来进行 DNA 染色，由于灵敏度不高，操作繁琐，实际使用较少。

6. 电泳结果记录

经荧光染料染色的凝胶，可经紫外灯照射激发出相应的可见的荧光，利用摄影技术将结果记录下来便于以后的详细分析、比较，不用担心长时间的分析对实验者的辐射或信号衰减。紫外透反射仪可以完成照射激发荧光的工作，但应选择有 302 nm 波长的仪器，因为与 366 nm、254 nm 紫外线比较，前者荧光的产生率最高，而对 DNA 的切口损伤最低。图像的采集使用光学相机、数码相机和 CCD 摄像头均可以，有条件的最好使用成套的有分析软件的凝胶图像分析系统。

4.3　聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质用于生物大分子分析的常用电泳技术之一，适用于低分子质量蛋白质、小于 1kb DNA 片段及 DNA 序列分析等。聚丙烯酰胺凝胶是由单体的丙烯酰胺($CH_2{=}CHCONH_2$，acrylamide，Acr)和交联剂甲叉双丙烯酰胺[$CH_2(NHCOHC{=}CH_2)_2$，N,N'-methylenebisacrylamide，Bis]聚合而成的三维网状结构，这一聚合过程需要有自由基催化完成(图 4.2)。常用的催化聚合方法有两种：化学聚合和光聚合。化学聚合通常是加入催化剂过硫酸铵(ammonium persulfate，AP)以及加速剂四甲基乙二胺(tetrame thyl ethylene diamine，TEMED)，这样由于乙烯基“$CH_2{=}CH{-}$”一个接一个的聚合作用就形成丙烯酰胺长链，同时甲叉双丙烯酰胺在不断延长的丙烯酰胺链间形成甲叉键交联，从而形成交联的三维网状结构。氧气对自由基有清除作用，所以通常凝胶溶液聚合前要进行抽气。丙烯酰胺的另一种聚合方法是光聚合，催化剂是核黄素，核黄素在光照下能够产生自由基，催化聚合反应，一般光照 2～3h 即可完成聚合反应。

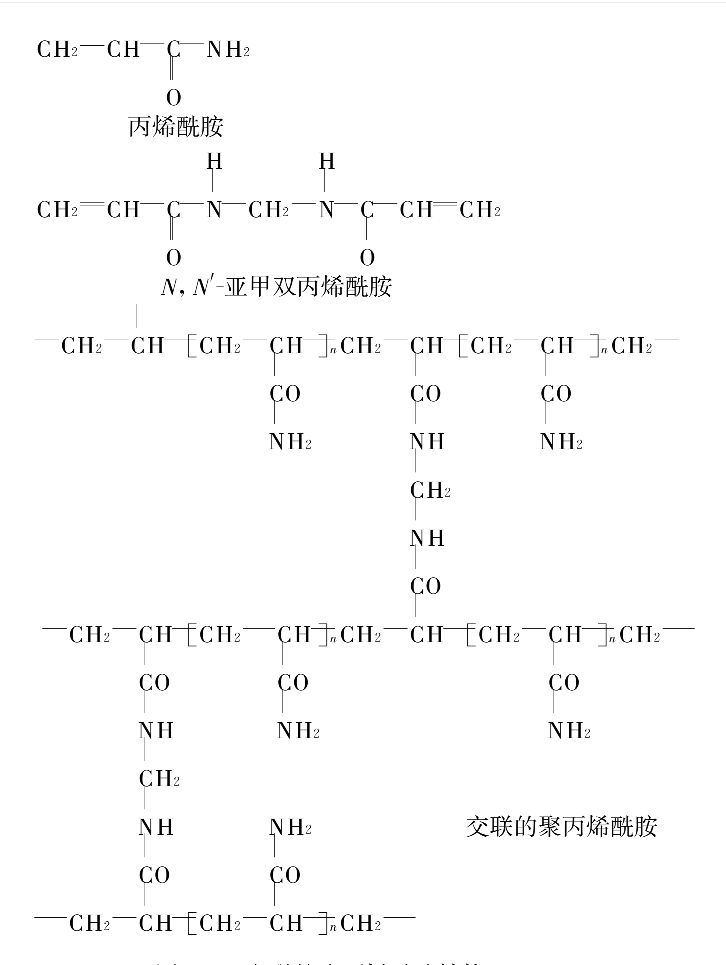


图 4.2 交联的聚丙烯酰胺结构

凝胶的多孔性取决于链的长度以及聚合反应过程中交联的程度。聚丙烯酰胺凝胶的孔径可以通过改变丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的浓度来控制,丙烯酰胺的浓度可以在 3%～30%之间。低浓度的凝胶具有较大的孔径,如 3%的聚丙烯酰胺凝胶对蛋白质没有明显的阻碍作用,可用于平板等电聚焦或 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的浓缩胶,也可以用于分离 DNA;高浓度凝胶具有较小的孔径,对蛋白质有分子筛的作用,可以用于根据蛋白质的相对分子质量进行分离的电泳,如 10%～20%的凝胶常作为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的分离胶。

聚合后的聚丙烯酰胺凝胶的强度、弹性、透明度、黏度和孔径大小均取决于两个重要参数 T 和 C,T 是丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺两个单体的总百分浓度,C 是与 T 有关的交联百分浓度。T 与 C 的计算公式是:

$$T\% = \frac{a+b}{m} \times 100\% \tag{4.12}$$

$$C\% = \frac{b}{a+b} \times 100\% \tag{4.13}$$

式中，a 为丙烯酰胺的质量(g)；b 为甲叉双丙烯酰胺的质量(g)；m 为水或缓冲液的体积(ml)。a 与 b 的比值对凝胶的筛孔、透明度和机械强度等性质有明显的影响。富有弹性且完全透明的凝胶，a 与 b 的比值应在 30 左右。$a:b<10$ 时，凝胶变硬呈乳白色；$a:b>100$ 时，5%凝胶呈糊状，且易断裂。选择 T 和 C 的经验公式是：

$$C = 6.5 - 0.3T \tag{4.14}$$

此式可用于计算 T 为 5%～20%时的凝胶组成。C 值并不很严格，在大多数情况下，可变化的范围约为 ±1%，当 C 保持恒定时，凝胶的有效孔径随着 T 的增加而减小。当 T 保持恒定，C=4%时，有效孔径最小，C>4%或 C<4%时，有效孔径均变大，C>5%时凝胶变脆，不宜使用。实验中最常用的 C 值是 2.6%和 3%，有些实验室采用 $a:b=19:1$ 的配方。

配成的 30%的丙烯酰胺水溶液在 4℃下能保存 1 个月，在储存期间丙烯酰胺会水解为丙烯酸而增加电泳时的电内渗现象并减慢电泳的迁移率。丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺是一种对中枢神经系统有毒的试剂，操作时要避免直接接触皮肤，但它们聚合后则无毒。

由于聚丙烯酰胺凝胶有突出的优点，近年来在蛋白质与 DNA 分离中得到广泛的应用，目前尚无更好的支持介质能够取代它，并且可根据蛋白质或 DNA 的分子质量或碱基长度准备不同浓度的凝胶(见表 4.5 和表 4.6)。其主要的优点有：①可以随意控制胶浓度"T"和交联度"C"，从而得到不同的有效孔径，用于分离不同分子质量的生物大分子；②能把分子筛作用和电荷效应结合在同一方法中，达到更高的灵敏度，为 10^{-9}～10^{-12} mol·L^{-1}；③由于聚丙烯酰胺凝胶是由—C—C—键结合的酰胺多聚物，侧链只有不活泼的酰胺基—CO—NH_2，没有带电的其他离子基团，化学惰性好，电泳时不会产生"电渗"；④由于可以制得高纯度的单体原料，因而电泳分离的重复性好；⑤透明度好，便于照相和复印，机械强度好，有弹性，不易碎，便于操作和保存；⑥无紫外吸收，不染色就可以用于紫外波长的凝胶扫描做定量分析；⑦还可以用作固定化酶的惰性载体。

表 4.5　凝胶浓度与分离蛋白质质量关系

凝胶浓度 T/% C=2%～6%	可分离蛋白质质量范围/kDa	凝胶浓度 T/% C=5%	可分离蛋白质质量范围/kDa
5	30～200	5	60～700
10	15～100	10	22～280
15	10～50	15	10～200
20	2～15	20	5～150

表 4.6　凝胶浓度与分离 DNA 质量关系

凝胶浓度 T/% C=3.3%	分离 DNA 分子范围/bp		凝胶浓度 T/% C=3.3%	分离 DNA 分子范围/bp
	双链	单链		双链
3.5	1000～2000	750～2000	12.0	40～200
5.0	80～500	200～1000	15.0	25～150
8.0	64～400	50～400	20.0	6～100

聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质最初是在玻璃管中进行的，后来发展起来的垂直平板电泳一次最多可以容纳20个样品，电泳过程中样品所处的条件比较一致，样品间可以进行更好的比较，重复性也更好。水平平板电泳近年来有很快的发展，与垂直平板电泳相比有其独特的优点：①由于凝胶可以直接铺在冷却板上，容易使凝胶冷却，因而可以加高电压以提高分辨率；②电泳速度快，通常只要1h左右，而圆盘电泳和垂直平板电泳一般需要3～4h；③因为可以使用薄胶，加样少，染色快，从而提高了灵敏度，而且容易保存，只要用甘油浸泡后自然干燥即可长期保存不会龟裂；④适用各种电泳方式，用途广泛，尤其是可以使用20世纪90年代才发展起来的只有水平电泳系统才能使用的新的半干技术，即用浸有少量缓冲液的半干的胶条代替通常所用的大量电极缓冲液，大大节约了试剂，简化了操作，提高了电泳速度。

4.3.1　聚丙烯酰胺凝胶电泳基本操作过程

1. 试剂准备

30%(W/V)丙烯酰胺配制：丙烯酰胺29g，甲叉双丙烯酰胺1g，加水100ml完全溶解。

3%过硫酸铵配制：过硫酸铵0.3g，加水至10ml，4℃保存，可在一周内使用，如－20℃保存可使用一个月。

10×电泳缓冲液(TBE)配制：Tris 108g，EDTA 9.3g，硼酸55g，pH调至8.2，加水到1000ml。

四甲基乙二胺(TEMED)：室温保存在棕色瓶中。

2. 制胶前的准备

制胶玻璃板及封条要彻底清洗，一般用中性洗涤剂浸泡，再用去离子水漂洗干净，最后用无水乙醇擦拭制胶面板待用。为防止凝胶与玻璃板粘连和制胶过程中产生气泡，事先应将玻璃板硅化(siliconise)，即通过熏蒸或刷洗的办法使硅化剂极薄层地附着在玻璃板表面。常用的硅化剂为二氯二甲基硅烷(dichlorodimethyl silane)，商品名为Siliconisel-25。为了灌胶时不漏胶，可在封条边和玻璃板之间涂

医用凡士林，也有人用冷却至50℃的1%琼脂糖凝胶封堵缝隙，或用胶带纸或医用橡皮膏将玻璃板的3个边缘封贴。

3. 制胶

根据所需的凝胶浓度配制凝胶溶液，参见表4.7，灌胶前加入TEMED。

表4.7 不同浓度凝胶溶液的配制

溶液	聚丙烯酰胺凝胶/%				
	3.5	5.0	8.0	12.0	20.0
30%丙烯酰胺	11.6	16.6	26.6	40.0	66.6
10×TBE缓冲液	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
水	76.3	71.3	61.3	47.9	21.3
3%过硫酸铵	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
TEMED	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005

有条件的可将配制好的溶液抽滤去气泡。加入TEMED后应马上用50ml的注射器抽吸液体注入，待梳子下面出现纹影线，标志凝胶聚合反应完成。

4. 电泳

将电泳样品与上样缓冲液混合(见琼脂糖凝胶电泳)，用微量注射器加入到上样池中。一般电泳槽顶部接负极，底部接正极，在8～10V·cm^{-1}电压条件下电泳。

5. 染色及观察

电泳结束后，取下凝胶浸入含有0.5μg·ml^{-1}溴化乙锭的电泳缓冲液中染色30min，水洗后在紫外透射仪上观察结果。

聚丙烯酰胺凝胶使用溴化乙锭染色的效果不如琼脂糖凝胶，有时采用银染来提高DNA染色灵敏度。银染过程如下：

固定。固定时间30min，固定液有三种选择：50%甲醇溶液、10%乙醇溶液；50%甲醇溶液、7%乙酸溶液；10%戊醛溶液。

洗涤。用去离子水振荡漂洗。目的是去除固定液。

银染。置凝胶于0.1%硝酸银溶液中浸泡，时间一般为30min。

显影。配制100ml的3%碳酸钠溶液加入50μl 37%甲醛溶液，用此液漂洗凝胶至有银颗粒析出，显色。

终止。待黑褐色电泳条带充分显色后，立即将2.3mol·L^{-1}柠檬酸溶液加入

显影液中，振动10min。终止反应不及时将产生过染现象。

水洗。取出凝胶，用去离子水冲洗，再浸入0.03 % 碳酸钠溶液中定影30min，取出后如马上用塑料袋密封可保存一定时间。

4.3.2 连续聚丙烯酰胺凝胶电泳

连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(continuous electrophoresis)是1959年Weintraub和Raymond最早创立的，是指电泳系统采用相同孔径的凝胶和相同的缓冲液(包括样品缓冲液、凝胶缓冲液和电极缓冲液)，在pH恒定、离子强度不同的条件下进行区带电泳。该技术是利用样品(如蛋白质)的电荷效应进行分离的，而凝胶的分子筛效应不明显，一般只用于分离简单的样品，分辨率不高。但由于其具有制胶简便、快捷、缓冲系统组成简单、pH恒定等优点，至今还有部分实验在使用该方法。

4.3.3 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳

不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(discontinuous electrophoresis)是20世纪60年代中期由Hjertè n、Orenstein和Davis创建并完善的电泳技术，是指使用不同孔径的凝胶和不同缓冲体系的电泳方式。在电泳过程中，凝胶按需要在一块玻璃板内被制成不同浓度的分离胶和浓缩胶，样品首先通过浓缩胶，在进入分离胶前由于堆积作用而被浓缩成一条窄带，然后在一定浓度或浓度梯度的分离胶上进行分离，既存在电荷效应，也有分子筛效应。虽然制胶操作过程复杂，但它具有分辨率高、能够分离复杂样品和浓缩胶可浓缩样品300倍等连续系统无法比拟的优越性，至今仍是国内外实验室广泛使用的主要电泳技术。

不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳之所以具有分离复杂体系的功能是因为其设计上具有如下特殊原理。

1. 电泳系统多种不连续性

(1) 不连续凝胶浓度。凝胶在一个体系中被制成不同浓度的浓缩胶和分离胶，导致凝胶孔径不同。浓缩胶浓度低，属于大孔胶，电泳中蛋白质颗粒泳动遇到的阻力小，移动速度快，浓缩胶只起浓缩作用，无分子筛作用；分离胶浓度高，属于小孔胶，蛋白质进入分离胶后遇到的阻力增大，移动速度减慢，具有了分子筛效应。

(2) 缓冲液离子成分的不连续性。常用的凝胶缓冲体系为Tris-HCl系统，其中浓缩胶与分离胶的浓度不同；电极缓冲液为Tris-Gly(甘氨酸)系统，甘氨酸在浓缩胶和分离胶中的解离程度不同。Cl^-和Gly^-在电场中虽带相同符号电荷，移动方向相同，但在浓缩胶中移动速度不同，形成离子层的不连续性。

(3) 缓冲液pH不连续性。一般情况下，浓缩胶缓冲液pH 6.8，分离胶缓冲液pH 8.9，电极缓冲液pH 8.3，样品缓冲液pH 6.8。浓缩胶与分离胶之间pH不同

是为了控制甘氨酸尾随离子的解离度，以控制样品的迁移效率。

（4）电位梯度的不连续性。电位梯度的差异是缓冲液中离子解离后自动形成的。

2. 不同物理效应共同作用

（1）浓缩效应。较稀的样品进入浓缩胶后首先被浓缩集中成一条窄带，再进入分离胶。

（2）凝胶的分子筛效应。样品中分子的大小和形状不同，在通过孔径均匀的分离胶时，受阻滞的程度不同而表现出不同的迁移率。球形小分子移动快，走在前面，反之则慢。

（3）电荷效应。样品中不同分子所带电荷不同，其迁移率就产生差异。

三种物理效应在电泳过程中不是独立的分别起作用，而是共同作用，按样品分子的带电量、大小和形状将其逐一分离。

3. 浓缩与分离作用特殊机制

在不连续系统中样品和浓缩胶缓冲液均使用 pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲系统，电极缓冲液为 Tris-Gly 系统。电泳开始后样品首先通过浓缩胶，缓冲系统中全部 HCl 解离成 Cl^-，其迁移率快，成为先导离子。甘氨酸解离度小，仅有 0.1%～1% 解离成 Gly^-，在浓缩胶中移动很慢，成为尾随离子。样品中的离子（如蛋白质）在此 pH 下也带负电，三种离子同时向正极迁移。Cl^- 的电泳迁移率最大，最初的迁移速率最快，走在最前面，Gly^- 迁移速率最慢，样品离子介于二者之间，这样在 Cl^- 后面形成低离子浓度区域，即低电导区，而低电导区会产生较高的电场强度，因此，Cl^- 后面的离子在较高的电场强度作用下会加速移动。达到稳定状态后，Cl^- 和 Gly^- 之间形成稳定移动的界面，即高电位梯度和低电位梯度之间形成稳定的向阳极移动的界面。此时蛋白质位于两个界面之间泳动，使其聚集在 Gly^- 和 Cl^- 的界面附近而被堆积成很窄的区带（可以被浓缩 300 倍），达到浓缩的目的。

当移动界面到达分离胶后，由于分离胶的 pH（通常 pH8.9）较大，甘氨酸离解度加大，电泳迁移速度变大，赶上并超过蛋白质。由于蛋白质在单位长度上带有相等的电荷，所以它们以相等的迁移速度从浓缩胶进入分离胶，进入分离胶后不再受 Gly^- 和 Cl^- 界面电导区的影响，在分离胶中以本身的电泳迁移速度进行电泳，向正极移动。由于聚丙烯酰胺的分子筛作用，小分子的蛋白质可以容易的通过凝胶孔径，阻力小，迁移速度快；大分子蛋白质则受到较大的阻力而被滞后，这样不同蛋白质就在分离胶中受到电荷效应和分子筛效应而被分离。

4.3.4　电泳操作应注意的问题

（1）制胶：首先按需要浓度制备分离胶，灌胶后应立即在分离胶液面上加入

3～4mm 的去离子水，目的是隔离空气中的氧并使胶面平整。待分离胶凝固后方可灌入浓缩胶。

(2) 预电泳：凝胶的聚合度一般在 90%以上，为聚合的单体，AP 和其他杂质可能会影响分离效果，必要时可进行预电泳。不连续聚丙烯酰胺凝胶的预电泳要在分离胶聚合后进行，用适当稀释的分离胶缓冲液作为电极缓冲液进行预电泳，之后用浓缩胶缓冲液清洗胶面后才能灌制浓缩胶。如果选用的是高纯度的 Acr、Bis 和 AP 等试剂，可以不用预电泳。也可采用加入 1%～5%的巯基乙醇或二六苏糖醇到缓冲液或样品中来抵消过硫酸的氧化作用。

(3) 电泳样品的要求：生物样品一般需要经过处理，否则不溶物质会导致拖尾或纹理现象，甚至会堵塞凝胶，可对样品进行离心、过滤、增加溶解性等除去沉淀。

样品溶液的离子强度不能太高，否则会降低蛋白质的电动电势，使电导过高，在样品部分电位梯度低，使样品的泳动速度慢，引起电泳分离界面模糊不清。一般在电泳开始后 5～10 min，样品可以进入凝胶，如果指示剂进入缓慢，则表示盐浓度即离子强度过高。

样品浓度的选择取决于样品中含有的组分和分析目的，是电泳成败的关键。样品浓度过高，电泳条带相互干扰，造成拖尾现象；样品浓度低不易观察到分离组分。一般未知样品的浓度最好选择做 0.1～20 $mg \cdot ml^{-1}$浓度系列稀释，摸索出最佳加样浓度后再进行电泳分析。用考马斯亮蓝(coomasie brilliant blue)染色，样品浓度为 1～2 $mg \cdot ml^{-1}$时即可得到清晰的蛋白质条带。而银染法染色时，样品的浓度比考马斯亮蓝法低 20～100 倍。

(4) 电泳：可采用恒压或恒流两种方式电泳。采用恒流时，通常选用低电流使样品进胶，然后加大电流进行分离。电极缓冲液可以反复使用，但下槽液中混入了凝胶中的杂质、催化剂和 Cl^-，所以再次使用时上下槽电极液不能混合或交换使用。染色后的凝胶最好使用凝胶图像分析仪记录分析，如果要保存凝胶，可以将其制成干胶，即凝胶在含有乙醇、乙酸和甘油的保存液中浸泡后，夹在用保存液浸湿的两张玻璃纸间制成“凝胶三明治”，晾干就可长期保存。

4.3.5 梯度凝胶电泳

梯度凝胶电泳通常也采用聚丙烯酰胺凝胶作介质，但不是在单一浓度(孔径)的凝胶上进行，而是形成梯度凝胶。从凝胶顶部到底部丙烯酰胺的浓度由低到高呈梯度变化，凝胶孔径由大到小。凝胶梯度是通过梯度混合器形成的，高浓度的丙烯酰胺溶液首先加入到玻璃平板中，而后溶液浓度呈梯度下降，因此，在凝胶的顶部孔径较大，而在凝胶的底部孔径较小。梯度凝胶电泳也通常加入 SDS，并有浓缩胶，电泳过程与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳基本类似。与单一浓度的凝胶相比，梯度凝胶有许多优点：①梯度凝胶比单一浓度凝胶的样品分离范围更宽，可以同时分

离较大范围分子质量的蛋白质。单一凝胶电泳对于分子质量超过其分离范围的蛋白质，过大或过小都不能分离。而梯度凝胶孔径范围比单一凝胶大，分子质量较大的蛋白质可以在凝胶顶部大孔径部分得到分离，而分子质量较小的蛋白质可以在凝胶底部小孔径部分得到分离，所以，分子质量较大和较小的蛋白质可以同时得到分离。例如，用4%～30%的梯度胶可以分离相对分子质量5万～200万的蛋白质。②梯度凝胶可以分辨分子质量相差较小，在单一浓度凝胶中不能分辨的蛋白质。电泳过程中，蛋白质在梯度凝胶中迁移，经过的孔径越来越小，直到凝胶的孔径不能通透，这样电泳过程中蛋白质就被浓缩，集中在一个很窄的区带中。分子质量略小的蛋白质可以迁移得更靠前一些，被集中在略前面的区带中。由于梯度凝胶孔径逐步变小，在蛋白质不能通透的孔径附近对蛋白质有浓缩作用，所以电泳后形成很窄的区带，可以分辨出分子质量相差较小的蛋白质。对于太稀的样品，在电泳过程中可以将样品分几次加样，大小不同的蛋白质分子质量最终都会滞留在其相应的凝胶孔径中而得到分离。③可以直接测定天然状态蛋白质的分子质量而不需要将其解离为亚基，因此，这一方法可以与SDS-PAGE测定分子质量的方法互为补充。

梯度凝胶电泳主要适用于测定球蛋白的分子质量，而对纤维蛋白则有较大的误差。由于分子质量的测定必须是在未知和标准蛋白质分子到达完全被阻止迁移的孔径时才能成立，因此，电泳时要使用较高的电压。例如，平板凝胶为0.5 mm厚，使用600 V电压，50 mA电流，电泳时间约2h。

梯度凝胶电泳分离样品的机制和操作过程与其他垂直板凝胶电泳基本相同，差别在于梯度凝胶的制备(表4.8)。梯度凝胶通常用梯度混合器制备，混合器有两个储液瓶，分别装有低浓度液和高浓度液，二者在搅拌器中混合，打开活塞后凝胶溶液缓慢流入电泳玻璃板中，当到达顶部时去除灌胶管，待完全聚合即可形成梯度凝胶。制备时应注意：为形成连续平滑的梯度，高浓度凝胶溶液中的蔗糖或甘油浓度要比低浓度溶液大，这可以增加凝胶溶液的比重，以阻止对流的干扰；低浓度溶液中的TEMED或AP浓度要比高浓度溶液中的高，以保证凝胶聚合总是从顶部向底部逐渐扩展。

表4.8　不同梯度凝胶的配制

溶液名称	浓缩胶	分离胶/%											
	4%	2.4～5.0		4～15		4～10		4～22.5		8～18		10～22.5	
单体储液/ml	0.65	2.34	4.87	3.90	14.60	3.90	9.70	3.90	16.87	7.8	13.50	9.70	16.87
浓缩胶缓冲液/ml	0.63	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

续表

溶液名称	浓缩胶	分离胶/%											
	4%	2.4～5.0		4～15		4～10		4～22.5		8～18		10～22.5	
分离胶缓冲液/ml	—	3.00	3.00	3.00	3.00	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
40%蔗糖溶液/ml	—	5.20	13.50	6.30	14.40	—	—	—	—	—	—	—	—
87%甘油/ml	1.40	—	—	—	—	0.00	8.40	0.00	8.4	0.00	8.40	0.00	8.40
蒸馏水/ml	2.32	19.49	8.63	16.8	0.00	22.35	8.15	22.35	0.98	18.45	4.35	16.55	0.98
10%TEMED/μl	—	112.5	30	112.5	30	112.5	30	112.5	30	112.5	30	112.5	30
10%过硫酸铵/μl	—	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	—

4.3.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是最常用的定性分析蛋白质的电泳方法,特别是用于蛋白质纯度检测和测定蛋白质相对分子质量。

十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium didecyl sulphate-PAGE,SDS-PAGE)是在欲电泳分离的样品中加入含有SDS和β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol)的样品处理液。SDS即十二烷基磺酸钠[$CH_3—(CH_2)_{10}—CH_2OSO_3—Na^+$],是一种阴离子表面活性剂即去污剂,它可以断开分子内和分子间的氢键,破坏蛋白质分子的二级和三级结构;强还原剂β-巯基乙醇可以断开半胱氨酸残基之间的二硫键,破坏蛋白质的四级结构。电泳样品加入样品处理液后,要在沸水浴中煮3～5 min,使SDS与蛋白质充分结合,以使蛋白质完全变性和解聚,并形成棒状结构。SDS与蛋白质结合后使蛋白质-SDS复合物上带有大量的负电荷,平均每两个氨基酸残基结合一个SDS分子,这时各种蛋白质分子本身的电荷完全被SDS掩盖,这样就消除了各种蛋白质本身电荷上的差异。样品处理液中通常还加入溴酚蓝染料作为指示剂。还需加入适量的蔗糖或甘油以增大溶液密度,使加样时样品溶液可以沉入样品凹槽底部。

蛋白质分析电泳所用的条件总是要确保蛋白质解离为单个多肽亚基并尽可能减少亚基之间的相互聚集。最常用的方法是一并使用强阴离子去污剂SDS与某种还原剂,在上样到凝胶之前加热使蛋白质解离。变性的多肽结合SDS后带上负电荷,由于多肽与SDS结合的量几乎总成正比而与其序列无关,因此SDS-多肽复

合物在聚丙烯酰胺凝胶中是按多肽的大小进行迁移的。在饱和状态下,每克多肽结合的去污剂大约可达 1.4 g,借助已知分子质量的标准参照物就可以估测出多肽链的分子质量大小。但对主链进行修饰(如 *N*-糖基化或 *O*-糖基化)则表观分子质量会受到显著影响,因此,糖基化蛋白质的表观分子质量不能真实地反映多肽链的实际分子质量。

在大多数情况下 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳系采用不连续缓冲系统进行,其电泳槽缓冲液的 pH 和离子强度与配胶的缓冲液不同。样品中的 SDS-多肽复合物在两极间电流接通后,被凝胶中形成的移动界面带动向前推进。样品通过多孔性的积层胶后复合物在分离胶表面聚集成一条很细的区带(或称积层)。由于不连续缓冲系统具有这种把样品中所有复合物都浓缩于极小体积中的能力,使 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的分辨率大大提高。

最广泛使用的不连续缓冲系统最早是由 Ornstein 和 Davis 在 1964 年设计的,样品和积层胶中含 Tris-HCl(pH6.8),上下槽缓冲液含 Tris-甘氨酸(pH 8.3),分离胶中含 Tris-HCl (pH 8.8)。系统中的所有组分都含有 0.1%的 SDS。样品和积层胶中的氯离子形成移动界面的先导边界,而尾随边界则由甘氨酸分子组成。在移动界面的两边界之间是一电导较低而电位梯度较陡的区域,推动样品中的多肽前移并在分离胶前沿积聚。此处分离胶 pH 较高,有利于甘氨酸的解离,形成的甘氨酸离子穿过堆积的多肽并紧随氯离子之后,在分离胶中泳动。SDS 多肽复合物从移动界面中解脱开来,在电位和 pH 均匀的区段泳动,通过分离胶的筛分作用按分子大小不同得到分离。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的有效分离范围取决于灌胶用聚丙烯酰胺的浓度和交联度,凝胶孔隙的大小随双丙烯酰胺∶丙烯酰胺比率的增加而变小,当此比率接近 1∶20 时空隙最小。多数 SDS 聚丙烯酰胺凝胶是按双丙烯酰胺∶丙烯酰胺为 1∶29 的比例配制的,经验表明这种凝胶能够分离大小相差只有 3%的多肽。表 4.9 给出了丙烯酰胺浓度为 5%～15%凝胶的线性分离范围。

表 4.9 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的有效分离范围

丙烯酰胺浓度/%	线性分离范围/kDa
15	10～43
12	12～60
10	20～80
7.5	36～94
5.0	57～212

注:丙烯酰胺∶双丙烯酰胺的分子比是 1∶29。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳与不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳所需的仪器、电泳槽及电泳准备过程基本相同,不同之处是凝胶缓冲液和样品的制备方法有差异。

1. 缓冲液配制

配制分离胶和浓缩胶所使用的凝胶缓冲液如表4.10和表4.11所示，其中均需加入10%的SDS。

表4.10 配制Tris-甘氨酸SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶所用溶液

成分	配制不同体积和浓度凝胶所需各成分的体积/ml							
	5	10	15	20	25	30	40	50
6%胶								
水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30%丙烯酰胺混合液	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5mol·L^{-1}Tris(pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%胶								
水	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30%丙烯酰胺混合液	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5mol·L^{-1}Tris(pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%胶								
水	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30%丙烯酰胺混合液	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5mol·L^{-1}Tris(pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%胶								
水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30%丙烯酰胺混合液	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5mol·L^{-1}Tris(pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5

续表

成分	配制不同体积和浓度凝胶所需各成分的体积/ml							
	5	10	15	20	25	30	40	50
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%胶								
水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30%丙烯酰胺混合液	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5mol·L^{-1}Tris(pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

注:据 Harlow and Lane(1988)修改。

表 4.11　配制 Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 5%浓缩胶所用溶液

成分	配制不同体积凝胶所需要各成分的体积/ml							
	1	2	3	4	5	6	8	10
水	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30%丙烯酰胺混合液	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0mol·L^{-1}Tris(pH6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10%SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10%过硫酸铵	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

注:据 Harlow and Lane(1988)修改。

2. 设备

电源需要一种可提供 500V 电压及 200mA 电流的电源。一般不连续缓冲系统要求用垂直凝胶进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。尽管自 Studier 1973 年引入该系统以来电泳槽和胶板的基本设计变化不大,但在电泳装置上还是做了许多小的改进。选择哪一种系统可依个人兴趣而定。

3. 实验方法

(1) SDS 聚丙烯酰胺凝胶的灌制:按表 4.10 所列出的数值依次混匀各成分。加完 TEMED 后聚合反应就立即开始,因此,要迅速旋动混合物并进行下一步操作。将丙烯酰胺溶液灌制后最好用巴氏吸管小心地在丙烯酰胺溶液上覆盖一层 0.1%SDS(丙烯酰胺浓度约为 8%的凝胶)或异丙醇(丙烯酰胺浓度约为 10%的凝

胶)，覆盖层可防止氧扩散到凝胶中抑制聚合作用。异丙醇能够溶解一些小型凝胶装置的塑料。此后即可制备浓缩胶。

(2) 制备样品并进行电泳：用适当体积 1×SDS 凝胶上样缓冲液制备样品，100℃加热 3 min 使蛋白质变性。应与含蛋白质标准参照物一同做变性处理。

疏水性特别强的蛋白质，比如那些含多个跨膜结构域的蛋白质，在 100℃煮沸 3 min 处理后可能会发生沉淀或聚合，为避免出现这种问题，可用较低温度(45～55℃)加热样品 1 h 以达到变性目的。

将电泳装置与电源连接(正极应接下槽)，在凝胶上加 8 V·cm^{-1}电压，待染料前沿进入分离胶后将电压提高到 15 V·cm^{-1}继续电泳，直至溴酚蓝到达分离胶的底部(约 4 h)，然后关闭电源。

电泳结束卸下凝胶后，在凝胶底部紧靠最左边那个孔(第一个上样槽)的位置切下一角，以标注凝胶的方位。若凝胶用于免疫印迹反应则不需要切角。至此可对凝胶进行固定，用考马斯亮蓝或银盐染色，或进行荧光自显影或放射性自显影，或者进行免疫印迹。

(3) SDS-聚丙烯酰胺凝胶的染色。

一般未标记的蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶分离后是通过染色进行观察的，染色可用考马斯亮蓝或银盐进行，考马斯亮蓝的染色反应相对快速而且直接一些。考马斯亮蓝能够非特异地与蛋白质结合但不能与凝胶结合，使蛋白质在透明的凝胶基质上呈现分离的蓝色条带。银染的方法虽然操作起来麻烦，但更灵敏。

在对凝胶电泳分离的蛋白进行检测时，与考马斯亮蓝染色相比，银染能够检测到浓度低近 100 倍的蛋白。银染鉴别蛋白质是根据其对银离子还原的差异性来鉴别的，这一还原反应类似于照相过程。考马斯亮蓝的试剂及试剂盒(如 Life Technologies 公司的 Blue Print Fast PAGE Stain)、银染的试剂盒都有市售商品。

考马斯亮蓝 R-250 最初被用作蛋白质染色的实验室试剂是在 1963 年由在澳大利亚国立大学 Stephen Fazekas de St. Groth 实验室工作的 Roben Webster 发明的，由于考马斯亮蓝 R-250 现已成为 Iroperial Chemical Industnes PLC 公司的商标，在生化试剂目录中这种染料一般称作亮蓝(brilliant blue)，有亮蓝 G 和亮蓝 R 两种形式，在颜色索引(colour index)中给出了不同的编号(42655 和 42660)。亮蓝 G 和亮蓝 R 在冷水中分别为微溶和不溶，在热水和乙醇中分别为可溶和微溶。这两种染料均能对经过固定的蛋白质有效地染色，使用浓度为溶于甲醇∶冰乙酸∶水(50∶10∶40，*V*/*V*)的 0.05%溶液。

考马斯亮蓝是一种氨基三苯甲烷染料，可与蛋白质形成较强的非共价复合物，复合物的形成可能是范德华力及与 NH_3 基团的静电作用两种作用的结果。考马斯亮蓝用于聚丙烯酰胺凝胶电泳后蛋白质的染色，蛋白质对染料的吸附与蛋白质的量大致成正比，符合朗勃-比尔定律。

通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离的多肽可同时用甲醇∶冰乙酸∶水溶液固定并用考马斯亮蓝 R-250 染色,这种三苯甲烷纺织染料又称为酸蓝 83。将凝胶浸泡在该染料的甲醇∶乙酸浓溶液中数小时,再经长时间脱色将凝胶中过量的染料扩散出去。

(4) 脱色后保存,将凝胶保存在水中,封存在塑料袋内。凝胶可无限期保存而染色强度不会降低。但固定的聚丙烯酰胺凝胶在水中保存时会溶胀,保存期间会发生变形,为避免这个问题,可将凝胶存放在含 20%甘油的水中。染色的凝胶不要在脱色液中保存,否则会使染色的蛋白条带褪色。

(5) 作为永久记录,可对凝胶进行拍照或制成干胶。

4.3.7 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳

等电聚焦(isoelectric focusing,IEF)是 20 世纪 60 年代中期问世的一种利用有 pH 梯度的介质分离等电点不同的蛋白质的电泳技术。由于其分辨率可达 0.01pH 单位,因此,特别适合于分离分子质量相近而等电点不同的蛋白质组分。

1. 等电聚焦的基本原理

等电聚焦的分离原理是在介质中通过加入两性电解质形成一个 pH 梯度,两性物质在电泳过程中会被集中在与其等电点相等的 pH 区域内,从而得到分离。

在 IEF 的电泳中,具有 pH 梯度的介质的分布是从阳极到阴极,pH 逐渐增大。蛋白质分子具有两性解离及等电点的特征,这样在碱性区域蛋白质分子带负电荷向阳极移动,直至某一 pH 位点时失去电荷而停止移动,此处介质的 pH 恰好等于聚焦蛋白质分子的等电点(pI)。同理,位于酸性区域的蛋白质分子带正电荷向阴极移动,直至到它们的等电点上聚焦为止。可见,等电点是蛋白质组分的特性量度,将等电点不同的蛋白质混合物加入有 pH 梯度的凝胶介质中,在电场内经过一定时间后,各组分将分别聚焦在与各自等电点相应的 pH 位置上,形成分离的蛋白质区带。

2. pH 梯度的组成

pH 梯度的组成方式有两种:一种是人工 pH 梯度,由于其不稳定,重复性差,现已不再使用;另一种是天然 pH 梯度。天然 pH 梯度的建立是在水平板或电泳管正负极间引入等电点彼此接近的一系列两性电解质的混合物,在正极端吸入酸液,如硫酸、磷酸或乙酸等,在负极端引入碱液,如氢氧化钠、氨水等。电泳开始前两性电解质的混合物 pH 为一均值,即各段介质中的 pH 相等,用 pH_0 表示。电泳开始后,混合物中 pH 最低的分子带负电荷最多,pI_1 为其等电点,向正极移动速度最快,当移动到正极附近的酸液界面时,pH 突然下降,甚至接近或稍低于 pI_1,这

一分子就不再向前移动而停留在此区域内。由于两性电解质具有一定的缓冲能力，可使其周围一定的区域内介质的pH保持在它的等电点范围。pH稍高的第二种两性电解质，其等电点为pI_2，也移向正极，由于$pI_2>pI_1$，因此定位于第一种两性电解质之后，这样，经过一定时间后，具有不同等电点的两性电解质按各自的等电点依次排列，形成了从正极到负极等电点递增、由低到高的线性pH梯度。

3. 两性电解质载体与支持介质

理想的两性电解质载体应在pI处有足够的缓冲能力及电导，前者保证pH梯度的稳定，后者允许一定的电流通过。不同pI的两性电解质应有相似的电导系数使整个体系的电导均匀。两性电解质的分子质量要小，易于应用分子筛或透析方法将其与被分离的高分子物质分开，而且不应与被分离物质发生反应或使之变性。常用的两性电解质是人工合成的一种复杂的多氨基-多羧基的混合物。不同的两性电解质有不同的pH梯度范围，既有较宽的范围(如pH3～10)，也有各种较窄的范围(如pH7～8)。要根据待分离样品的情况选择适当的两性电解质，使待分离样品中各个组分都在两性电解质的pH范围内，两性电解质的pH范围越小，分辨率越高。

常用的pH梯度支持介质有聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶等，其中聚丙烯酰胺凝胶最常用。由于等电聚焦过程需要蛋白质根据其电荷性质在电场中自由迁移，通常使用较低浓度的聚丙烯酰胺凝胶(如4%)以防止分子筛作用，也经常使用琼脂糖，尤其是对于分子质量很大的蛋白质。

4. 电泳操作

等电聚焦多采用水平平板电泳，也使用管式电泳。由于两性电解质的价格昂贵，使用1～2 mm厚的凝胶进行等电聚焦价格较高。使用两条很薄的胶带作为玻璃板间隔，可以形成厚度仅为0.15 mm的薄层凝胶，大大降低成本，所以等电聚焦通常使用这种薄层凝胶。制作等电聚焦薄层凝胶时，首先将两性电解质、核黄素与丙烯酰胺储液混合，加入到带有间隔胶条的玻璃板上，而后在上面加上另一块玻璃板，形成平板薄层凝胶。经过光照聚合后，将一块玻璃板橇开移去，将一小薄片湿滤纸分别置于凝胶两侧，连接凝胶和电极液(阳极为酸性溶液，如磷酸，阴极为碱性溶液，如氢氧化钠)。接通电源，两性电解质中不同的等电点的物质通过电泳在凝胶中形成pH梯度，从阳极侧到阴极侧pH由低到高呈线性梯度分布。而后关闭电源，上样时取一小块滤纸吸附样品后放置在凝胶上，通电30 min后样品通过电泳离开滤纸加入凝胶中，这时可以去掉滤纸。最初样品中蛋白质所带的电荷取决于放置样品处凝胶的pH，等电点在pH以上的蛋白质带正电，在电场的作用下向阴极移动，在迁移过程中，蛋白质所处的凝胶的pH逐渐升高，蛋白质所带的正电

逐渐减少，到达 pH＝p*I* 处的凝胶区域时蛋白质不带电荷，停止迁移。同样，等电点在上样处凝胶 pH 以下的蛋白质带负电，向阳极移动，最终在到达 pH＝p*I* 处的凝胶区域停止。可见等电聚焦过程中无论样品加在凝胶上什么位置，各种蛋白质都能向着其等电点处移动，并最终到达其等电点处，对最后的电泳结果没有影响。所以有时样品可以在制胶前直接加入到凝胶溶液中。使用较高的电压(如 2000V，0.5mm 平板凝胶)可以得到较快速的分离(0.5～1h)，但应注意对凝胶的冷却以及使用恒定功率的电源。

凝胶结束后对蛋白质进行染色时应注意，由于两性电解质也会被染色，使整个凝胶都被染色，所以等电聚焦的凝胶不能直接染色，要首先经过 5％或 10％的三氯乙酸的浸泡以除去两性电解质后才能进行染色。

等电聚焦还可以用于测定某个未知蛋白质的等电点，将一系列已知等电点的标准蛋白(通常 p*I* 在 3.5～10)及待测蛋白同时进行等电聚焦，测定各个标准蛋白电泳区带到凝胶某一侧边缘的距离对各自的 p*I* 作图，即得到标准曲线。而后测定待测蛋白的距离，通过标准曲线即可求出其等电点。

等电聚焦具有很高的灵敏度，特别适合于研究蛋白质微观不均一性，例如一种蛋白质在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中表现单一带，而在等电聚焦中表现三条带。这可能是由于蛋白质存在单磷酸化、双磷酸化和三磷酸化形式。由于几个磷酸基团不会对蛋白质的分子质量产生明显的影响，因此在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中表现单一带，但由于它们所带的电荷有差异，所以在等电聚焦中可以被分离检测到。同工酶之间可能只有一两个氨基酸的差别，利用等电聚焦也可以得到较好的分离效果。由于等电聚焦过程中蛋白质通常是处于天然状态的，所以可以通过生物活性染色的方法对酶进行检测。等电聚焦主要用于分离分析，但也可以用于纯化制备，虽然成本较高，但操作简单、纯化效率很高。除了通常的方法，制备性等电聚焦也可以在垂直玻璃管中的梯度蔗糖溶液或颗粒状凝胶(如 Sephadex G-75)中进行。

4.3.8　印迹法(转移电泳)

印迹法(blotting)是指将样品转移到固相载体上，而后利用相应的探测反应来检测样品的一种方法。1975 年，Southern 建立了将 DNA 转移到硝酸纤维素膜(nitrocellulose，NC)上，并利用 DNA-DNA 杂交检测特定的 DNA 片段的方法，称为 Southern 印迹法。Alwine 等于 1977 年用类似的方法应用到 RNA 的印迹分析，称为 Northern 印迹法。1979 年，Towbin 将此法应用到单向电泳后的蛋白质分子的印迹分析，称为 Western 印迹法。1982 年，Reinhart 报道了对双向电泳后蛋白质分子的印迹分析，称为 Eastern 印迹法。每一种印迹法又可分为斑点印迹法和电泳转移印迹法，前者是将样品直接吸附于固相载体上，而后者是先电泳分离

样品再转移到固相载体表面,其余操作基本相同。此法由于操作过程所需试剂量少,灵敏度高,故应用相当普遍。

1. 概念

探针:用化学方法将有识别能力的物质(如抗原、核酸等)和酶或同位素、荧光物质(如地高辛、异硫氰荧光素等)结合而成,用于鉴别目的复合物均可称为探针。

固相载体:用于吸附材料。包括:硝酸纤维素膜、尼龙膜(nylon-desed menmbranes,NDM)、重氮苄氧甲基膜(diazobenzyloxymethyl,DBM)和重氮苄硫醚纸(diazophenylthiaether,DPT)等。常用的是孔径为 0.45μm 的 NC 膜,价廉,结合力强,背景较清晰。理想的载体是带正电的尼龙膜。

封阻:用一种与待测物质不反应的物质(如蛋白质、核酸、吐温-20 等)封闭载体印迹区以外的剩余吸附位点,保证探针仅与印迹物反应,且不吸附到载体上的过程。

印迹:把经凝胶电泳分离后的组分,通过吸附或电转移或直接点样的方式吸附到固相载体上,此过程称电泳印迹或称点印迹。

放射自显影:将含放射性同位素的复合物置 X 感光胶片上,当放射性同位素电离辐射时,胶片上会发生化学感光作用,随后经显影技术就可呈现出斑点或谱带影像。此过程称为放射自显影。

2. 原理

生物大分子物质印迹到固相载体上,经封阻试剂处理后,可与相应的探针反应,再用适当的溶液漂洗,置含有底物的溶液中培育,即可显出谱带。如选用的探针是同位素标记物,通过放射自显影,即可检出样品中特异成分。

3. 操作与注意事项(以蛋白质印迹为例)

蛋白质印迹法首先是要将电泳后分离的蛋白质从凝胶中转移到硝酸纤维素膜上,通常有毛细管印迹法和电泳印迹法。毛细管印迹法是将凝胶放在用缓冲液浸湿的滤纸上,在凝胶上放一片硝酸纤维素膜,再在上面放一层滤纸等吸水物质并用重物压好,缓冲液就会通过毛细作用流过凝胶,如图 4.3 所示。缓冲液通过凝胶时会将蛋白质带到硝酸纤维素膜上,硝酸纤维素膜可以与蛋白质通过疏水作用产生不可逆的结合。这个过程持续过夜,就可以将凝胶中的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,但这种方法转移的效率较低,通常只能转移凝胶中一小部分蛋白质(10%~20%)。电泳印迹可以更快速有效的进行转移。这种方法是用有孔的塑料和有机玻璃板将凝胶和硝酸纤维素膜夹成“三明治”形状,而后浸入两个平行电极中间的缓冲液中进行电泳,选择适当的电泳方向就可以使蛋白质离开凝胶结合在硝酸纤

维素膜上。



图 4.3 转移电泳装置示意图

转移后的硝酸纤维素膜就称为一个印迹(blot),用于对蛋白质的进一步检测。印迹首先用蛋白质溶液(如 10%的 BSA)处理以封闭硝酸纤维素膜上剩余的疏水结合位点,而后用所要研究的蛋白质的抗血清(一抗)处理,印迹中只有待研究的蛋白质能与一抗结合,而其他蛋白质不能与一抗结合,这样清洗去除未结合的一抗后,印迹中只有待研究的蛋白质的位置上结合着一抗。处理过的印迹进一步用适当标记的二抗处理。二抗指一抗的抗体,如一抗是从鼠中获得的,则二抗是抗鼠 IgG 的抗体。处理后,带有标记的二抗与一抗结合,可以指示一抗的位置,即是待研究的蛋白质的位置。目前有结合各种标记物的抗特定 IgG 的抗体可以直接购买作为标记的二抗。最常用的一种是酶连二抗,印迹用酶连二抗处理后,再用适当的底物溶液处理,当酶纯化底物生成有颜色的产物时,就会产生可见的区带,指示所要研究的蛋白质的位置。在酶连抗体中使用的酶通常是碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。碱性磷酸酶可以将无色的底物 5-溴-4-氯吲哚磷酸盐(BCIP)转化为蓝色的产物;而辣根过氧化物酶可以以 H_2O_2 为底物,将 3-氨基-9-乙基咔唑氧化成褐色产物或将 4-氯萘酚氧化成蓝色产物。另一种检测辣根过氧化物酶的方法是用增强化学发光法。辣根过氧化物酶在 H_2O_2 存在下,氧化化学发光物质鲁米诺(luminol,氨基苯二酰一肼)并发光,在化学增强剂存在下光强度可以增大 1000 倍,通过将印迹放在照相底片上感光就可以检测出辣根过氧化物酶的存在。除了使用酶连二抗作为指示剂,也可以使用其他指示剂,主要包括以下一些:

I^{125} 标记的二抗:可以通过放射性自显影检测。

荧光素异硫氰酸盐标记的二抗:可以通过在紫外灯下产生荧光来检测。

I^{125} 标记的金黄色葡萄球菌蛋白 A(Protein A):Protein A 可以与 Ig G 的 Fc 区特异性结合,因此 Protein A 可以代替二抗,I^{125} 标记的 Protein A 可通过放射性自显影检测。

金标记的二抗:二抗通过微小的金颗粒包裹,与一抗结合时可以表现红色。

生物素结合的二抗:印迹用生物素结合的二抗处理后,再用碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记的凝集素处理。生物素可以与凝集素紧密结合,这种方法实际上相当于通过生物素与凝集素的紧密结合将二抗与酶连接,通过酶的显色反应就可以进行检测。这种方法的优点是由于生物素是一个小分子蛋白,一个抗体上可以

结合多个生物素,也就可以结合多个酶连接的凝集素,大大增强了显色反应的信号。

除了使用抗体或蛋白质作为检测特定蛋白的探针以外,有时也使用其他探针,如放射性标记的DNA,可以检测印迹中的DNA结合蛋白。

实验中应选择参照体系,良好的参照体系通常包括分子质量Marker(用来确定蛋白条带对应的分子质量大小),空白载体对照(如果是诱导表达体系,还应该有诱导前的对照),已知量标准产物的正对照,另外还有内参。特别是蛋白质定量分析,进行电泳时需要等量上样,此步骤会存在操作误差。在Western印迹实验时使用内参,即可简便地对定量和上样步骤产生的误差进行校正。在Western印迹中使用内参其实就是在该过程中用内参对应的抗体检测内参,这样在检测目的产物的同时可以检测内参的表达,由于内参在各组织和细胞中的表达相对恒定,借助检测每个样品内参的量就可以校正上样误差,这样半定量的结果才更为可信。此外,使用内参可以作为空白对照,检测蛋白转膜情况是否完全、整个Western印迹显色或者发光体系是否正常。常用的蛋白质内参有3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)和细胞骨架蛋白beta-actin或beta-tubulin。

4.3.9 双向凝胶电泳

双向凝胶电泳(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)与质谱技术和蛋白质组信息学是蛋白质组研究的三大关键核心技术。双向电泳技术在蛋白质组与医学研究中所处位置十分重要,可用于蛋白质转录及转录后修饰研究,蛋白质组的比较研究和蛋白质间的相互作用研究,细胞分化凋亡研究,致病机制及耐药机制的研究,疗效监测,新药开发,癌症研究,蛋白纯度检查,小量蛋白纯化,新替代疫苗的研制等许多方面。双向电泳由于具有高分辨率和高灵敏度已成为分析复杂蛋白混合物的基本工具。

1975年O'Farrel等建立了这种技术。2-DE的第一向电泳是等电聚焦电泳,然后通过SDS-PAGE对蛋白质进行第二向电泳。在细管(直径1～3 mm)中加入含有两性电解质、8mol·L^{-1}的脲以及非离子型去污剂的聚丙烯酰胺凝胶进行等电聚焦,变性的蛋白质根据其等电点的不同进行分离。而后将凝胶从管中取出,用含有SDS的缓冲液处理30 min,将处理过的凝胶条放在SDS-PAGE浓缩胶上,加入丙烯酰胺溶液或熔化的琼脂糖溶液使其固定并与浓缩胶连接。在第二向电泳过程中,结合SDS的蛋白质从等电聚焦凝胶中进入SDS-聚丙烯酰胺凝胶,在浓缩胶中被浓缩,在分离胶中依据其分子质量大小被分离。这样各个蛋白质根据等电点和分子质量的不同而被分离、分布在二维图谱上。再用考马斯亮蓝或银染进行检测,经分析软件对结果进行比对、解析。由于蛋白质的等电点和分子质量是两个彼

此不相关的重要性质，而 2-DE 同时利用了蛋白质间的这两个性质上的差异分离蛋白质，因此 2-DE 的分离能力非常强大，细胞提取液的二维电泳可以分辨出 1000～2000 个蛋白质，还有些报道可以分辨出 5000～10 000 个斑点（spot），这与细胞中可能存在的蛋白质数量接近。2-DE 在分离蛋白混合样品、比较差异方面有不可替代的作用，结合质谱鉴定技术可查明大型蛋白复合物各组组分，与其他生物技术如分子生物学、分子遗传工程、免疫学、微量蛋白质的自动氨基酸序列分析相结合，可以快速准确地发现和鉴定新的蛋白质。

目前 2-DE 技术尚未完善，手工操作较多，经验性强，双向电泳存在许多局限性，如重复性差，疏水蛋白、低表达量蛋白、极酸和极碱性蛋白、分子质量较小和较大蛋白的分离还较为困难，高通量自动化尚未达到等。尽管如此，双向电泳仍然是目前分离蛋白质最有效的方法之一。

4.4 自由流电泳

自由流电泳（free flow electrophoresis，FFE）是基于无固相基质的自由流电泳系统。它为蛋白质组学研究提供了高通量、高重现性、高灵敏度和操作简便的解决方案。其高灵敏度和高准确性使得对目标蛋白的分离比以往任何方法都更为有效，配备的 96 孔收集装置和连续分离方案使得对低丰度目标蛋白的处理同样拥有高回收率，而非变性电泳条件使得纯化后的功能蛋白更易保持活性。

4.4.1 原理

电泳在无胶的一种薄层液相基质中进行，原理如图 4.4 所示。样品通过专用的蠕动泵注入分离腔。分离腔由两个平行的特制平板构成，腔体高 0.5 mm。层流驱动样品在分离腔中运动，带电粒子（蛋白质、细胞器、膜类或完整的细胞等）在分离缓冲液中，由垂直于液体流方向的高电压驱动，流动方向发生偏斜而被分离。

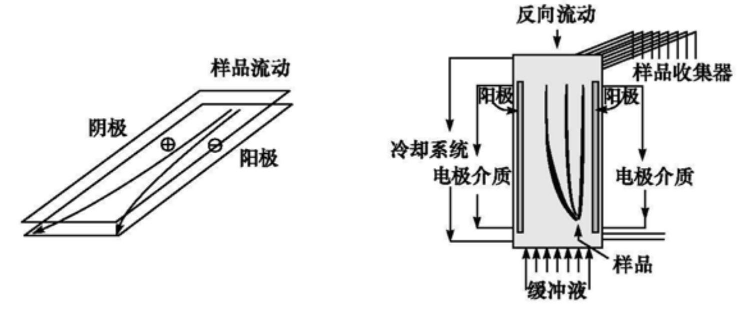


图 4.4　电泳原理示意图

根据等电点、分子质量大小、分子形状等泳动能力不同，样品被分离成96个组分，收集到96孔收集器中。

连续自由流电泳是由连续流动的支持流动相缓冲液携带样品相在电场的作用下实现分离的一种电泳分离技术。它的特点是无需支持介质（如广泛采用的凝胶电泳），可避免其他材料对分离产物的污染；分离过程是连续的，产率可以很高。它不仅可用于分析，还可用于制备，发展潜力很大。最近十几年来，随着生物工程突飞猛进的发展和大量纯净生物样品制备需求的产生，连续自由流电泳越来越受到人们的重视。

然而，重力作用引起的自然对流破坏了分离流场的均衡和稳定性，同时也限制了分离样品的浓度，因此，一直阻碍着连续自由流电泳的发展。解决自然对流的一个可能的方案是在微重力环境中操作。在微重力空间，密度差异不会引起沉淀，体积大小的变化也不会引起对流运动，电泳过程有望得到极大的改善。

4.4.2 技术特点

样品适应性广：从离子、分子、多肽、蛋白质、细胞器到细胞均可适用。

可连续运行：达2～3周。

回收率高：蛋白样品可达98%。

分辨率高：0.1 pH。

时间短：30 min。

通量高：IEF模式下可达50 mg · h^{-1}。

兼容性好：可兼容上下游所有的分析处理方法。

4.4.3 操作模式

区带电泳模式(ZE)：可以快速分离细胞器、膜和细胞等生物颗粒混合物。

等电聚焦模式(IEF)：蛋白质回收率达98%，上样量为50 mg · h^{-1}。

等速电泳(ITP)：分离范围更宽，可分离手性化合物、激素和离子等。

4.5 毛细管电泳

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)又称为高效毛细管电泳(high performace capillary electrophoresis, HPCE)，是近年来发展最快的分析方法之一。毛细管电泳技术是一类以毛细管为分离通道，以高压直流电场为驱动力，根据样品中各组分之间迁移速度和分配行为上的差异而实现分离的一类液相分离技术，它使分析技术从微升水平进入纳升水平，并使细胞分析，乃至单分子分析成为可能。

传统电泳最大的局限是难以克服由高电压引起的焦耳热。1967年，Hjerten

最先提出在直径 3 mm 的毛细管中做自由溶液的区带电泳。现代毛细管电泳技术是由 Jorgenson 和 Lukacs 在 1981 年首先提出的，他们使用了 75 mm 的毛细管柱，用荧光检测器对多种组分实现了分离。1984 年，Terabe 将胶束引入毛细管电泳，开创了毛细管电泳的重要分支：胶束电动毛细管色谱。1987 年，Hjerten 等把传统的等电聚焦过程转移到毛细管内进行。同年，Cohen 发表了毛细管凝胶电泳的工作。近年来，将液相色谱的固定相引入毛细管电泳中，又发展了毛细管电色谱，扩大了电泳的应用范围。毛细管电泳技术兼有高压电泳及高效液相色谱的优点，其突出特点是：

(1) 它是在内径 10～200 μm 的石英毛细管中进行的，在毛细管中的散热性好，沿着管截面的温度梯度很小，因此，可以提高加在毛细管两端的工作电压，所加电压可高达几十千伏。

(2) 它不需要阻流介质，但可使用凝胶(或大分子介质)作分子筛介质。

(3) 使用在线柱检测法，缩短分析时间，结合计算机处理数据，实现自动化操作。

(4) 灵敏度高，检测方式多，检测器除了未能和原子吸收及红外光谱连接以外，其他类型检测器均已和 CE 实现了连接检测。检测限可达 10^{-13}～10^{-15} mol，使用激光诱导的荧光检测限可达 10^{-19}～10^{-21} mol。

(5) 分辨率高，理论塔板数为每米几十万至几百万。

(6) 取样量少，有时只需几个纳升，流动相只需几毫升，实验成本低、消耗少。

(7) 操作模式多，开发分析方法容易，应用范围极广。

毛细管电泳技术可检测多种样品，如血清、血浆、尿样、脑脊液、红细胞、体液或组织及其实验动物活体实验；且可用于分离分析多种组分，如核酸/核苷酸、蛋白质/多肽/氨基酸、糖类/糖蛋白、酶、碱氨基酸、微量元素、维生素、杀虫剂、染料、小的生物活性分子等的快速分析，以及 DNA 序列分析和 DNA 合成中产物纯度测定等，甚至可用于碱性药物分子及其代谢产物、无机及有机离子/有机酸、单细胞分析、药物与细胞的相互作用和病毒的分析，如在缓冲液中加入表面活性剂则可用于手性分离中性化合物。由于技术本身的优势以及分离生物大分子的能力，使 CE 成为常用分析方法之一。

4.5.1 毛细管电泳的基本原理

1. 电泳淌度

毛细管电泳分离是基于组分固有的淌度不同，在电场作用下形成不同的迁移速度而进行的。一个离子在电场中的迁移速度为：

$$v = \mu_e E \tag{4.15}$$

式中，v 为离子移动速度；μ_e 为电泳淌度；E 为电场强度。

电泳淌度是一常数。半径小、电荷大的离子具有较大的电泳淌度；而半径大、电荷小的离子具有较小的电泳淌度。电泳淌度的差异，构成了电泳分离的基础。

2. 电渗

电渗(electroomosis)是毛细管电泳的基本现象之一，可控制组分的迁移速度和方向，进而影响毛细管电泳的分离模式、分离进程和分离重现性等。

电渗或电渗流(electroomotic flow，EOF)是指管内溶液在电场作用下整体朝一个方向运动的现象，如图 4.5 所示。对于石英毛细管来说，在 pH＞3 的情况下，由于硅醇基(—SiOH)电离成 SiO^-，使管壁表面带负电，为了保持电荷平衡，溶液中水合离子(一般为阳离子)被吸附到表面附近，形成双电层。在高电压作用下，双电层中的水合阳离子引起流体整体地朝负极方向移动的现象叫电渗。粒子在毛细管内电解质中的迁移速度等于电泳和电渗流两种速度的矢量和。正离子的运动方向和电渗流一致，故最先流出；中性粒子的电泳流速度为“零”，故其迁移速度相当于电渗流速度；负离子的运动方向和电渗流方向相反，但因电渗流速度一般都大于电泳流速度，故它将在中性粒子之后流出。这样因各种粒子迁移速度不同而实现了分离。

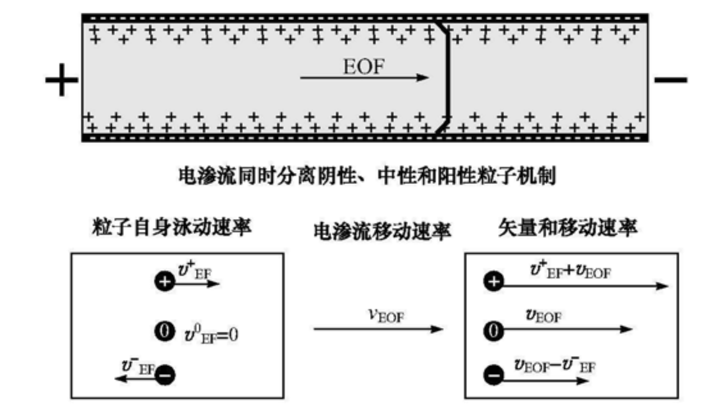


图 4.5　电渗产生示意图

电渗是区带毛细管电泳中推动流体前进的驱动力，它使整个流体像一个塞子一样以均匀的速度向前运动，使整个流型呈近似扁平型的“塞式流”。它使溶质区带在毛细管内在原则上不会扩张。在高效液相色谱中，采用的压力驱动方式使柱中流体呈抛物线型，其中心处速度是平均速度的两倍，导致溶质区带本身扩张，引起柱效下降，使其分离效率不如 CE。

电渗的大小可用电渗速度或电渗淌度来表示：

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta}E \tag{4.16}$$

$$\eta_{eo} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \tag{4.17}$$

式中，v_{eo} 为电渗速度；μ_{eo} 为电渗淌度；ζ 为双电层的 Zeta 电位；ε 为分离介质的介电常数。

图 4.6 为毛细管电泳电渗流和高效液相液体流的比较，这是毛细管电泳获得高效分离的重要原因之一。

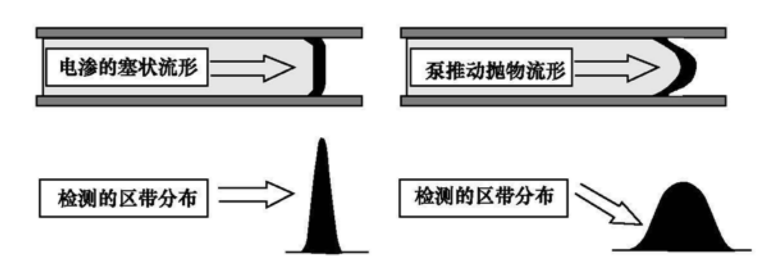


图 4.6 电渗流与液相色谱流比较示意图

电渗淌度与硅氧层表面的电荷密度成正比，与离子强度的平方根成反比。在低 pH 条件下，硅氧层形成分子(Si—OH)，因而减少了表面电荷密度，故电渗速度减小。如在 pH 9 的硼砂缓冲液中电渗速度约 2 mm·s^{-1}，而在 pH 3 介质中电渗速度可减小约一个数量级。影响电渗的一个重要因素是毛细管中因电流作用产生的焦耳热，它使得柱中心的温度高于边缘的温度，形成抛物线形的温度梯度，管壁附近温度低，中心温度高，结果使电渗速度不均匀而造成区带变宽，柱效降低。为此，应避免使用过长和内径大于 50μm 的毛细管柱，还应注意减小毛细管的壁厚、选择适宜的电压和缓冲液及使用良好的冷却系统。

CE 中观察到的离子淌度是离子的电泳淌度 μ_{ep} 和溶液的电渗淌度的加和。定义表观淌度为 μ_{app}，则

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \tag{4.18}$$

根据以上的讨论，带正电荷的离子的 $\mu_{ep} > 0$，$\mu_{eo} > 0$，故 μ_{app} 总是为正，离子向阴极移动；而带负电荷的离子受电泳流的影响被阴极排斥，$\mu_{ep} < 0$，在高 pH 条件下，若 $\mu_{eo} > \mu_{ep}$，μ_{app} 仍为正，离子仍然可向阴极移动，但在低 pH 条件下，μ_{app} 为负，离子将向反方向移动。此时必须改变电场方向，方可检测到欲分析的离子。

对于实际速度为 μ_{net} 的组分，表现淌度可由下式计算：

$$\mu_{app} = \frac{\mu_{net}}{E} = \frac{Ld/t}{V/t} \tag{4.19}$$

式中，Ld 为从进样口到检测器的实际柱长；V 为电压；t 为所需的分析时间。

实际测试电渗淌度时可用中性组分，此时 $\mu_{ep}=0$，$\mu_{eo}=\mu_{app}$，$\mu_{ep}=\mu_{eo}$，则式(4.19)为：

$$\mu_{eo}=\frac{\mu_{中性}}{E}=\frac{Ld/t}{V/t} \tag{4.20}$$

CE 的毛细管容易冷却，故可以使用 20～30 kV 的高电压，由于管内径只有 25～100 μm，无涡流扩散，使传质阻抗趋于零，因此有很高的分辨率。电解质液由毛细管阳极端进入毛细管，携带被分离的组分可以从毛细管阴极端流入检测器的比色池，电泳过程与结果分析均容易自动化。因此，CE 已成为效率极高的现代分析仪器，在生物化学与分子生物学中得到日益广泛的应用。

电渗流的另一个特点是可以使几乎所有的样品组分不管带电不带电、电荷大小、带负电还是带正点都以同样的方向移动。各自组分在毛细管中的流出时间(迁移时间)取决于电渗流速度和组分电泳速度的矢量和。在一般情况下，电渗流方向从阳极到阴极，且电渗速度大于电泳速度，所以，阴离子(除无机离子)也在阴极流出。因此，合理地利用电渗流可以使阳离子、中性分子、阴离子实现同时分离分析。

电渗流的控制：电渗流是毛细管电泳中的基本操作要素，为了优化分离条件，往往需要控制电渗流。控制电渗流最基本的方法有：①电压增加，EOF 增加；②缓冲溶液的 pH 增加，EOF 增加；③缓冲溶液的离子强度越大，浓度越高，EOF 越大；④黏度越小，EOF 的速度或淌度越大；⑤温度越大，EOF 越大；⑥在缓冲溶液中加有机/无机改性剂；⑦改变毛细管内壁的表面电荷。

3. 毛细管与焦耳热

在内径很细的毛细管中进行电泳分离与传统电泳比较，主要是减少了焦耳热的影响。焦耳热会引起电泳分离介质的温度梯度、黏度梯度和速度梯度，从而引起区带展宽。毛细管允许高电场下电泳分离，但焦耳热的产生使高电场的使用受到限制。高场强导致电流增加，引起毛细管中电解质产生焦耳热(自热)，自热将使流体在径向产生抛物线形温度分布，即管轴中心温度要比近壁处温度高。因溶液黏度随温度升高呈指数下降，温度梯度使介质黏度在径向产生梯度，从而影响溶质迁移速度，使管轴中心的溶质分子要比近管壁的分子迁移得更快，造成谱带展宽，柱效下降。一般来说温度每提高 1 ℃，将使淌度增加 2%。

温度改变使焦耳热和温度梯度的控制方法：①降低电压；②降低离子强度；③降低缓冲溶液浓度；④减小毛细管内径；⑤采用毛细管温控系统。

4. 分离效率和分离度

分子扩散与理论塔板数：在 CE 中，仅存在纵向扩散，$\sigma^2=2Dt$，扩散系数小的

溶质比扩散系数大的溶质分离效率高,这是分离生物大分子的依据。延用色谱的理论塔板数来表示电泳分离效率,则

$$N = \left(\frac{l}{\sigma}\right)^2 \tag{4.21}$$

式中,N 为分离效率;l 为毛细管有效长度;σ 为纵向扩散系数。

实际的分离效能理论塔板数可以直接从电泳谱图中求得:

$$N = 5.54\left(\frac{t_m}{W_{1/2}}\right)^2 \tag{4.22}$$

式中,t_m 为迁移时间;$W_{1/2}$ 为半峰宽度。

分离度:与色谱分离一样,用峰分离度可以表示电泳分离质量的好坏。分离度 R 定义为:

$$R = 0.177 \cdot \frac{\Delta\mu}{\mu_{平均}} \sqrt{\frac{\mu_{ap} V L_{ef}}{DL}} \tag{4.23}$$

$$\mu_{平均} = \frac{\mu_{ap_1} + \mu_{ap_2}}{2} \tag{4.24}$$

影响分离度的主要因素有工作电压 V、毛细管有效长度与总长度比和有效淌度差。分离度可按谱图直接由下式计算:

$$R = \frac{t_{m_2} - t_{m_1}}{(W_1 + W_2)/2} \tag{4.25}$$

式中,t_m 为迁移时间;W 分别代表两个组分峰底宽度。

4.5.2　毛细管电泳的仪器与操作

毛细管电泳仪器主要包括进样系统、毛细管、高压电源、缓冲液池、检测器和数据处理系统,如图 4.7 所示。

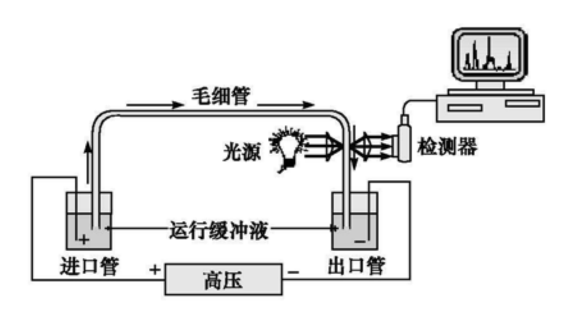


图 4.7　毛细管电泳仪结构示意图

1. 进样技术

在毛细管电泳中常采用的进样方式为电迁移进样和流体动力学进样，如图4.8所示。为了保持高效率，取样体积应控制在10 ml以内。进样体积对毛细管电泳效率有显著影响，减少注入管内的样液体积，将会增加分离效率。一般说来，样品组分带所占管长应少于总管长的1%～2%。

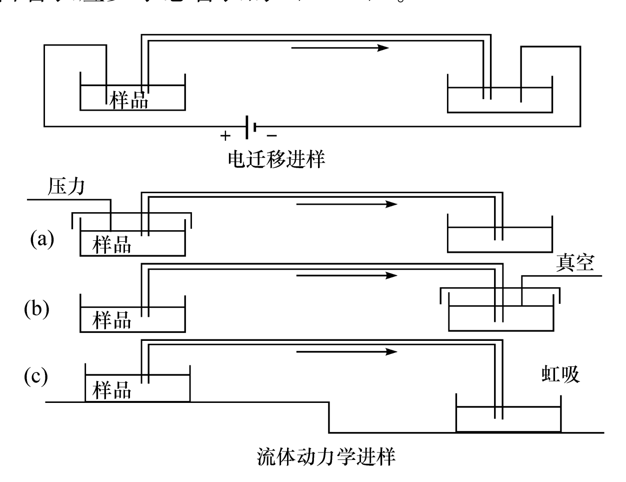


图4.8 毛细管电泳仪进样方式示意图

1）电迁移进样

进行电迁移法进样时，将含样品液的储瓶代替一端的缓冲液储瓶，并通过样液瓶引入高压电。电路按一定的时间周期接通，一般是几秒钟接通一次，以使得进入毛细管的样品区带变窄。然后断电，并将缓冲储瓶代替样液瓶，再通入高压电，使电泳过程开始。为使电压沿管线分布均匀，应使样液与缓冲液有相近的电导率。电动进样对毛细管内的填充介质没有特别限制，属普适性方法，可实现完全自动化操作，也是商品仪器必备的进样方法。不过电动进样对离子组分存在进样偏向，即迁移速度大者多进，小者少进或不进，这就是所谓的进样歧视现象，这种现象会降低分析的准确性和可靠性。

2）流体动力学进样

压力进样也叫流动进样，它要求毛细管中的填充介质具有流动性，比如溶液等。当将毛细管的两端置于不同的压力环境中时，管中溶液即能流动，将样品带入。在仪器的实际设计过程中，一般又分为正向压力进样和负向的真空或虹吸进样3种方式。可用3种方法产生：正压、负压（管尾抽吸）或重力（虹吸），压力取值

一般在±3450Pa(约0.5psi)附近,进样时间的取值在1～5s,有时可超过60s。利用压缩空气(如钢瓶气)可以实现正压进样,并能和毛细管清洗系统共享,多为商品仪器采用。负压进样需要特别精密的控制设计,容易因泄露等原因出现不重复进样。正、负压进样都需要密封技术。压力进样没有进样歧视现象,但选择性差,样品及其背景都同时被引进管中,对后续分离可能产生影响。

2. 分离系统

在毛细管电泳中,参与电泳分离的硬件系统主要包括毛细管、毛细管恒温系统、直流高压电源、电极和缓冲液池。

(1) 毛细管:电泳分离过程的核心部件是毛细管电泳柱。毛细管内径非常小,外保护层很厚,便于弯曲使用，如图4.9所示。理想的毛细管材料应该具备化学惰性、电惰性、紫外可见光透光性、柔韧性、强度高、耐用而且便宜等特性。目前毛细管柱材料有熔融石英、聚四氟乙烯和玻璃等,其中最常用的为熔融石英。石英毛细管外壁涂一层聚酸亚胺保护层,以增强弹性,便于操作。但为了柱上光学检测,需要将毛细管外壁中一段聚酸亚胺保护层除去以形成一个检测小窗口。聚四氟乙烯材料可以透过紫外光,不需要特殊的光学检测窗。常用的毛细管有效长度为30～75cm,所使用的毛细管内径一般在25～100μm范围内。

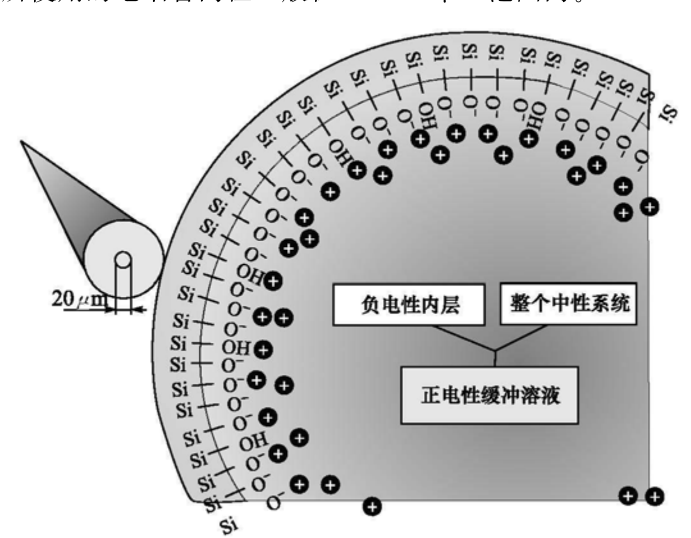


图4.9　毛细管及毛细管内离子化示意图

(2) 毛细管恒温系统:有高速气流恒温和液体浴恒温两种方式。

(3) 直流高压电源：常用的高压电源为0～30 kV,操作电压稳定在±0.1%,电流200～300μA。

(4) 电极和缓冲液池：电极应选择具有化学惰性、导电性能好的铂电极;缓冲

液池一般用小玻璃瓶或聚四氟乙烯离心管，缓冲液要经常更换。

3. 检测系统

迄今为止，除了原子吸收光谱、电感耦合等离子体发射光谱(ICP)及红外光谱未用于CE外，其他检测手段如紫外、荧光、电化学、质谱、激光等类型检测器均已用于CE。但常用的是紫外-可见光检测、二极管阵列检测。

已有多种灵敏度很高的检测器为毛细管电泳提供质量保证，如紫外检测器(UV)、激光诱导荧光检测器(LIF)、能提供三维图谱的二极管阵列检测器(DAD)以及电化学检测器(ECD)。由于毛细管的管径细小、散热快，即使是高的电场和温度，都不会向常规凝胶电泳那样使胶变性，影响分辨率。

(1) 光学检测器：按检测方式可分为固定波长或可变波长检测器及二极管阵列或波长扫描检测器两类。前一类检测器采用滤光片或光栅来选取所需检测波长，优点在于结构简单，灵敏度比后一类检测器高；后一类检测器能提供时间-波长-吸光度的三维图谱，优点在于在线紫外光谱可用来定性鉴别未知物。有些二极管阵列检测器还可做到在线峰纯度检查，即在分离过程中便可得知每个峰含有几种物质，缺点在于灵敏度比前一类略差。为了提高检测灵敏度，一种新的激光诱导共振能转移(laser induced resonance energy transfer)检测方法已经诞生，例如，EDTA和镧系化合物特别是 Tb^{3+}(在水杨酸存在下)形成三元络合物，此络合物于pH 3的条件下稳定而有荧光，能量从水杨酸向 Tb^{3+} 转移，这一过程可提高检测的灵敏度。

由于CE检测池的光路长度即为毛细管的内径，一般不超过100 μm，因此，细内径的毛细管柱限制了紫外检测器的灵敏度。欲提高检测灵敏度，可采用以下几种方法：①优化测定波长的信噪比来选择最佳测定波长，以提高灵敏度。②减少检测噪声：主要通过提高光源强度；采用聚焦、狭缝等减少背景光的影响；采用电子和数字滤波，设计良好的信号放大系统来改进。除了常用的氘灯和原子蒸气灯(汞、锌、镉灯)外，还有一种“笔式线光源镉灯”(pen-ray lamp)，可将光线聚焦到毛细管上。③扩展吸光光路长度：可通过很多巧妙的设计来扩展光路长度，如：为了克服圆柱形毛细管表面引起散射、失真等不利的光学特性及增加光路长度，可用矩形或扁形毛细管。如用50 μm×1000 μm截面的矩形管，光路长度扩大20倍，可使信噪比增加15倍，当然柱效也就会有所下降。也有采用“泡型”或“Z型”特殊毛细管的，如泡型毛细管可使光径从50 μm增至500 μm；Z型可使光径从50 μm增至3 mm，增加了近60倍，可使信噪比提高至原来的6倍，但因体积增加将引起20%～30%的谱带扩张，导致柱效下降。

(2) 荧光检测器：普通荧光检测器采用氘灯(低波长UV区)、氙弧灯(UV到可见光区)和钨灯(可见光区)作为激发光源，对荧光黄检测限可达2 ng · ml^{-1}。另一种为激光诱导荧光检测器(LIF，图4.10)，激光的高光流量、聚光性、单色性

等特点使其成为理想的激发源。常用氦-镉激光器(325 nm)和氩离子激光器(488 nm),对荧光黄最低检测限为 10^{-11} mol · L^{-1}。LIF 检测器主要由激光器、光路系统、检测池和光电转换器件等部分组成。按入射激光、毛细管和荧光采集方向的对应位置,CE 的 LIF 系统可分为正交型和共线型两种。

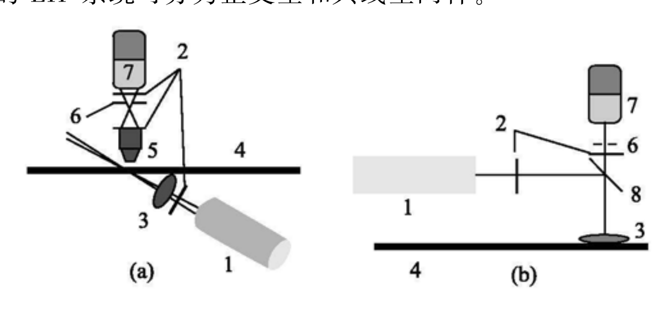


图 4.10 LIF 检测器结构

(a) 正交型;(b) 共线型

1-激光器;2-干涉滤光器;3-聚焦透镜;4-毛细管;5-采光透镜;6-狭缝;7-光电倍增管;8-双色镜

正交结构中荧光采集透镜垂直于毛细管和入射激光所构成的平面。共线结构中光源、聚焦光和荧光共面,且入射光和发射荧光采用同一透镜聚焦。

近年在毛细管电泳中出现一些新的荧光检测器,如有人提出在类似盖革计数器(near-Geiger)操作下的雪崩光电二极管可用作毛细管电泳荧光检测器;基于激光波混合的方法以提高毛细管电泳的灵敏度;为提高灵敏度使用双光子激发荧光检测器等。

(3) 化学发光检测器:把 HPLC 化学发光检测器用于毛细管电泳。

(4) 电荷耦合检测器:近年来在毛细管电泳中电荷耦合检测器(charge-coupled device,CCD)受到人们的重视。有些学者把 CCD 用于矩形薄层槽电泳的检测上。

(5) 电化学检测器:电化学检测器(EC)可避免 CE 中光学类检测器遇到的光程太短的问题。EC 和 LIF 同为 CE 中灵敏度最高的检测器,电化学检测器的研究已有不少,有安培型电化学检测器(在固定电压下测定电流的大小)和伏安型电化学检测器(在不同的电压下测定电流)。前者使用较多,因为仪器简单、检测限也很低,但是安培法只能提供一个电流随时间变化的信息,而伏安法还可以得到电流随电压变化的信息,这样有助于在混合物中鉴定个别化合物,对分离不好的化合物提供一个用电化学方法解决问题的机会。在安培法检测中近年的研究有一些新的改进,如改进的柱尾安培法检测、用刻蚀毛细管壁形成半透膜作连接器的安培检测器、毛细管电泳中用盘状工作电极进行柱尾安培检测的电流理论的研究、用于微米和亚微米连续槽电泳分离的阵列电化学检测器。

(6) 质谱检测器:CE 和能提供组分结构信息的质谱(MS)联用,是分析技术的跨越式进步。已有商品 CE /MS 系统,提供了一种分离和鉴定相结合的强有力的

技术。CE/MS在线联用，接口系统是其“心脏”，既要保持CE的高效性，又要满足MS仪器的要求，通常需考虑样品离子化技术和CE/MS接口的设计。虽然有多种离子化技术可用于MS，但用于CE/MS的仅有快原子轰击(FAB)和大气压离子化(API，其中又可分为电喷雾ESI和离子喷雾ISP)两种。接口设计有同轴接口和液体连接接口。

4.5.3　毛细管电泳分离的优化

1. 毛细管电泳的操作电压

最佳操作电压的选择：在不产生过多焦耳热的前提条件下，尽可能使用高电压。分离柱效随电压的增大而提高。

电源工作模式的选择：有恒压、恒流、恒功率和场强程序。

2. 毛细管电泳的缓冲溶液

缓冲溶液的选择对于毛细管电泳的成功分离十分重要。电渗流对于pH的改变非常敏感，所以要求使用缓冲溶液以维持恒定的pH。缓冲液的有效缓冲范围是pH在pK_a±1的区间内，在毛细管电泳中使用的缓冲溶液应该从以下几个方面优化：

(1) 在所选的pH范围内应有较强的缓冲能力。优化原则：①为了得到合适的电泳淌度，缓冲液的pH必须比被分离物质的等电点高或低1个pH单位；②为了使毛细管壁上的吸附和电渗流降低，提高毛细管涂层的寿命，应尽可能采用酸性缓冲液；③ 注意pH不同会改变液体流动方向，如蛋白质的等电点低于缓冲液pH时，极性放置是正极→负极，反之应是负极→正极。

(2) 避免缓冲液在检测波长处有低的紫外吸收，造成背景干扰过强。

(3) 尽量保持较低的淌度(即分子质量大、电荷小的离子)以降低所产生的电流。使用较多的缓冲液是：磷酸缓冲液、乙酸缓冲液、硼酸缓冲液。一般情况下，缓冲液浓度增加，被分离物质的迁移速度下降(图4.11)，有利于分离效果的提高。

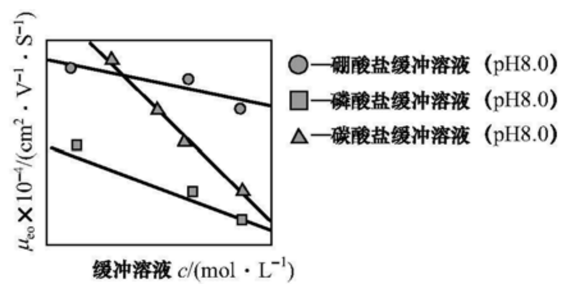


图4.11　离子强度对电渗流的影响

但随着缓冲液浓度的增大，黏度增加，电渗流和焦耳热增大，会给分离造成反作用。在其他条件相同，浓度相同而阴离子不同时，毛细管中的电流有较大差别，如表4.12，因此产生的焦耳热不同。缓冲溶液离子强度、双电层的厚度、溶液黏度和工作电流明显影响电渗流大小。缓冲溶液离子强度增加，电渗流下降。

表 4.12　不同阴离子构成的缓冲液对电渗淌度的影响

阴离子	$B_3O_7^{2-}$	Cit^{3-}	Ac^-	PO_4^{3-}	HCO_3^-
工作电流 $I/\mu A$	137.4	246.5	74.5	162.0	69.0
电渗流 $\mu_{eo}\times10^{-5}/(cm^2\cdot V^{-1}\cdot S^{-1})$	41.2	47.7	49.0	49.7	51.8

注：测定条件：缓冲液浓度 50 mmol · L^{-1}，工作电压 20 kV。

3. 缓冲溶液添加剂

常用添加剂有如下几类：①表面活性剂，如季铵盐等，是毛细管电泳分离中使用最广泛的缓冲液添加剂。表面活性剂可作为电渗流的改性剂，同时也可扩大分离对象的范围。②有机溶剂，如甲醇、乙腈等，有机溶剂作为一种改性剂常常加到缓冲溶液中，以改变毛细管内壁和缓冲液性能。③无机盐，如 K_2SO_4、LiCl 等，可缩短分析时间和增加灵敏度。④两性离子，如三甲铵基甲内盐等，能改善分离度和重现性。⑤手性试剂，如环糊精、冠醚等，添加手性试剂是进行手性物质分离的最佳手段。

总之，添加剂的加入能够增加溶液黏度、降低电流、控制 EOF 大小与方向、优化分离条件，从而达到增强分离选择性、缩短分析时间、提高分离度的目的。

4.5.4　毛细管电泳不同分离模式与作用

1. 毛细管区带电泳

毛细管区带电泳（capillary zone electrophoresis，CZE）是毛细管电泳中最基本、应用最广泛的一种分离模式。电泳过程中，在毛细管中仅填充缓冲液，加电后基于溶质组分的迁移淌度的不同而分离，如图 4.12 所示。除了溶质组分本身的结

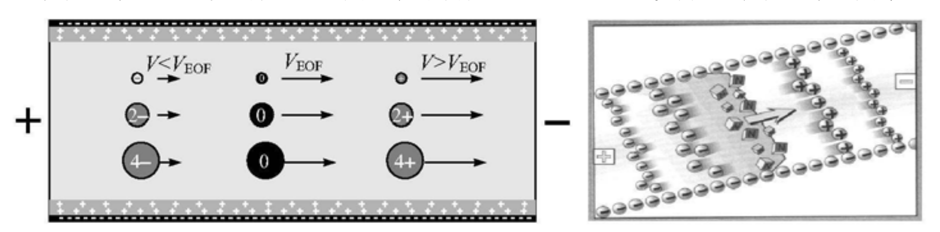


图 4.12　毛细管区带电泳示意图

构特点和缓冲液组成外,不通过其他因素如聚合物网络、pH 梯度或另一分配相对分离条件产生影响。CZE 分离体系无需固体支持介质,不存在基质效应,能分离淌度差别很小的组分。CZE 中由于电渗流的存在,阴、阳离子可以同时分析,中性溶质电泳迁移为零,与电渗流同时流出。CZE 的特点是操作简单、快速、分离效率高、应用范围广。

2. 胶束电动毛细管色谱

胶束电动毛细管色谱(micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC 或 MEKC)是电泳技术和色谱技术巧妙结合的分离新技术。MECC 是在电泳分离缓冲液中加入离子型表面活性剂胶束,使电中性物质能根据其在胶束相和水相的分配系数不同而进行分离,如图 4.13 所示。1984 年,Terabe 等为了解决毛细管电泳不能用于中性分子分离检测的问题,提出了胶束电动色谱,不仅能测定离子,而且能测定中性分子。MECC 是毛细管电泳中唯一能同时分离中性物质和离子型物质的分离模式,也是目前研究较多、应用较广的一种毛细管电泳操作模式。

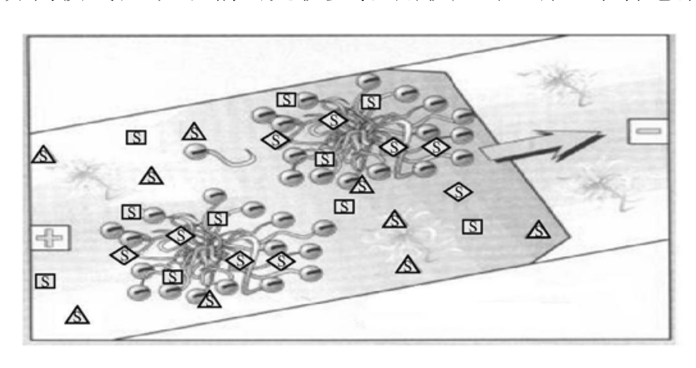


图 4.13　MEKC 的分离原理

在胶束电动色谱中,一般向缓冲溶液中加入一定量的表面活性剂(如十二烷基磺酸钠),形成胶束作为准固定相。由于胶束的泳动速度与水相的电泳淌度不同,不同组分在水相和胶束相的分配也就不同。中性溶质在以电渗流驱动的水溶液相和胶束相之间进行分配,疏水性较强的溶质与胶束的作用较强,结合的溶质较多也较稳定,相对于疏水性较弱的溶质迁移较慢,未结合的溶质则随电渗流流出。因此,中性溶质按其疏水性不同,在两相间的分配系数不同而得到分离。MECC 实际上是一种区带电泳技术,只是用离子胶束溶液代替 CZE 中简单的缓冲溶液,从而引起电泳行为和分离机制上的差别。

有多种物质可以利用 MECC 进行分离分析,但通常使用的表面活性剂具有一定的不足:①常用的表面活性剂把胶束的稳定建立在表面活性剂与缓冲溶液之间的平衡上,这种平衡随表面活性剂的临界胶束浓度及分析条件(如温度、pH、样品

浓度等)的改变而变化,因此,分析方法的重现性不够稳定。②小分子表面活性剂的使用限制了 MECC 与质谱检测的联用,小分子表面活性剂的存在对质谱的小分子物质检测产生干扰。

作为一个理想的准固定相,必须具备以下特点:①稳定性要好,即在不同分析条件下可以具有相同的保持因子;②要具有较高的电泳淌度和较低甚至为零的临界胶束浓度,能够提供较宽的迁移时间范围;③是单分散性的,并且在准固定相和缓冲溶液之间能快速地进行物质转移,实现有效分离的目的;④对可用的检测器必须是惰性的,或影响很小;⑤与分析样品的分配或吸收是可逆的,即不与样品产生化学作用。目前,已有多种物质用作 MECC 的准固定相,如环糊精用于手性物质的分离,聚乙烯吡咯烷酮用于对映体非对映衍生物的分离,蛋白质用于手性物质的分离等。而最有前途的还是用聚合物作为 MECC 的准固定相。

用作准固定相的聚合物大致可以分为聚合胶束、聚合物表面活性剂、枝状高分子三类, 见表 4.13。其中,聚合胶束是指胶束的聚合物;聚合物表面活性剂是指具有表面活性剂性质的聚合物;而枝状高分子则是指以一个核为中心逐步合成的多分枝聚合物。在胶束电动色谱中,这些物质都形成了稳定的准固定相,临界胶束浓度为零,这就可以以任意浓度来使用这些准固定相,同时它们的结构也不随分析条件的变化而变化,为其应用打下了良好的基础。这些准固定相可以在大量有机溶剂改性的缓冲液中保持稳定的结构,另外,还可以和质谱联用而不干扰小分子质量物质的检测。和 SDS 相比,它们可以形成对一种物质单一的选择作用。这些优点使它们在 MECC 中的应用前景极为广阔。

表 4.13　三种聚合物的比较

名称	优点	应用范围
聚合胶束	稳定性好,单分散性,可在较宽的缓冲液浓度范围内使用	多核芳烃、苯衍生物
聚合物表面活性剂	重现性好,可在高浓度有机缓冲液内使用,可和质谱联用	疏水化合物、手性化合物
枝状高分子	在有机缓冲液中稳定,单分散性,具有大量官能化链端基	苯和衍生物、芳香族碳氢化合物

第一个成功用作 MECC 准固定相的聚合胶束是聚十一碳烯酸钠。这种聚合物的合成过程为,单体通过 γ 射线照射、紫外线照射以及自由基引发等多种方式引发聚合反应,但反应前单体浓度一定要在临界胶束浓度以上,以形成进行聚合反应的胶束。利用该聚合物作 MECC 准固定相,在 50%甲醇或 45%乙腈改性的缓冲液中进行烷基邻苯二酸酯和多核芳烃的分离获得成功。这种聚合胶束的优点在于它的稳定性好,在疏水化合物的分离过程中加入有机溶剂改性剂对准固定相的分

离性能影响不大。聚合胶束对疏水化合物显示出良好的选择性。乙腈改性剂在30%～40%,聚合胶束的电泳淌度稳定增加,因而提供了一个很宽的洗脱范围。与SDS胶束相比较,聚合胶束对极性化合物有更强的选择性。但聚合物也存在不足,在重复使用几次后,缓冲液变暗,同时迁移时间和保持因子随时间延长而增长或增大。前者主要是由于羧基的影响和阳极缓冲液的水解,后者则是由于有机改性剂的挥发。

目前研究最多的聚合物表面活性剂是丙烯酸类共聚物。在用丙烯酸类共聚物——聚丙烯酸丁酯-甲基丙烯酸丁酯-甲基丙烯酸(BBMA)作准固定相进行苯取代物、萘取代物以及疏水化合物(n-烷基苯、多核芳烃等)的分离时,与SDS胶束相比,对苯衍生物具有相似的选择性,而对萘衍生物的选择性则相差较大。pH和聚合物组成对分离性能有影响,在pH<4时,聚合物因表面缺少电荷而不能溶解,共聚物中甲基丙烯酸含量增多时也能够达到同样的效果,即表面电荷增多,洗脱范围扩大,保持因子降低。但在准固定相性能调节时,改变聚合物组成结构要比改变pH效果好,它不会引起聚合物电泳淌度和溶质保持因子的变化。

枝状高分子是指以一个核为中心,经过多步的合成过程而制得的带有许多分枝的一类聚合物。其分子内部没有像线性聚合物内部那样的卷曲的长分子链,而是由许多分枝组成,每个分枝都带有一个可以官能化的链端基。在合成过程中,各步反应是重复进行的,即每一次都是进行同样的反应,并且每完成一次这样的反应就称为“一代”。这种聚合物也被称作“单分子胶束”,但与通常胶束不同,它们在分子外部具有空间阻力,分子内部则是亲水性或疏水性的。这些高分子具有许多作准固定相的优点:它们在有机溶剂改性的缓冲液中能保持稳定,并且还是单分散性的;大量的官能化链端基的存在使它们可以具有不同的化学特性,或经过改性,产生独特的选择性。第一个把枝状高分子用作电动色谱的载体是合成的聚胺基酰胺的一至四代聚合体,并且通过水解作用又制得了羧酸盐形式的二代半枝状高分子。这些高分子可用在水缓冲液中苯衍生物和萘衍生物的分离,及在甲醇改性的缓冲液中多核芳烃的分离。它们的选择性明显不同于SDS胶束与三甲胺十六烷基氯胶束,保持因子也比较小。枝状高分子对溶质的键合随分子体积的增大而加强。由于分子内胺基基团的存在,在对多核芳烃的分离中,碱性条件下具有比酸性条件下更强的作用能力。

在胶束电动力学毛细管色谱中加入有机调节剂会使溶质的容量因子发生变化。一般认为有机溶剂的加入主要会影响流动相和准固定相的相比。实际上有机调节剂的影响是多方面的,这些影响可以概括为:①影响溶质在胶束相和水溶液相中的分布;②改变胶束化学平衡;③影响水溶液相-胶束相中添加剂-表面活性剂之间的相互作用;④影响胶束离子化的聚集数和体积等。

调节剂在胶束中可能有一定的溶解度,但这一现象对于胶束在电泳过程中的

迁移速度几乎没有影响，有机添加剂对溶质容量因子的影响主要反映为其对表面活性剂临界胶束浓度的影响。在一级调节剂浓度不变的情况下，溶质容量因子与表面活性剂浓度之间可满足很好的线性关系。常用的有机添加剂为甲醇、乙腈、二氧六环、二甲基亚砜和异丙醇等。

3. 毛细管凝胶电泳

毛细管凝胶电泳(capillary gel electrophoresis，CGE)是将凝胶电泳对生物大分子的高效分离能力和毛细管电泳的快速、微量和定量分析相结合而成为当今分离度极高的一种电泳分离技术。1983 年，Hjerten 首次将传统凝胶电泳技术中的聚丙烯酰胺凝胶装入 150 μm 的玻璃毛细管，以消除毛细管内壁对蛋白质的吸附，并利用这种方法对多种蛋白质进行了分离，取得了很好的分离效果。1987 年，Cohen 等使用了 100 μm 内径以下的弹性石英毛细管，用同管内壁交联的方法制备凝胶柱，分离了蛋白质、DNA 和寡聚核苷酸。1990 年，Lux 等对 Cohen 等的柱制备技术进行了改进，提出了用线性聚丙烯酰胺对柱内表面预处理和用 γ 射线引发聚合的方法，在分离 DNA 内切片段和寡聚核苷酸时取得了极好的效率。

1）CGE 的原理

在 CGE 中溶质的分离依赖于溶质的净电荷性质和分子大小两个因素。凝胶的网络结构对溶质具有分子筛作用，当带电溶质通过聚合物网络时产生了阻碍，溶质分子越大，阻碍越大。尤其是对那些荷质比不随分子大小而变的大分子，如 DNA 或 SDS-蛋白质复合物，没有凝胶的筛分作用就不能分离。凝胶具有多孔性，起类似分子筛的作用，溶质按分子大小可逐一分离。凝胶黏度大，能减少溶质的扩散，所得峰形尖锐，能达到 CE 中最高的柱效。常用聚丙烯酰胺在毛细管内交联制成凝胶柱，可分离、测定蛋白质和 DNA 的分子质量或碱基数，但制备麻烦，使用寿命短。如采用黏度低的线性聚合物，如甲基纤维素代替聚丙烯酰胺，可形成无凝胶但有筛分作用的无胶筛分(non-gel sieving)介质。它能避免空泡形成，比凝胶柱制备简单，寿命长，但分离能力比凝胶柱略差。CGE 和无胶筛分正在发展成第二代 DNA 序列测定仪，将在人类基因组计划中起重要作用。

2）CGE 特点

电泳是在极细内径毛细管中进行，电阻高，能用很高的电压电泳而产生的焦耳热小。毛细管的表面积与体积比大，能快速有效散热，极大地提高了速度和分离率。热的不均匀容易引起对流导致分离区带展宽混合，凝胶的应用进一步压制了对流，改善了分辨率。高效、快速、高分辨率、低成本以及高分辨率结合荧光检测只需微量进样，充分体现了 CGE 的优势，特别是凝胶的网格结构非常

适合对 DNA、蛋白质类大分子的分离，这类分子因扩散系数小很难用高效液相色谱分离。

3）毛细管凝胶柱的类型

凝胶是一种抗对流介质，并具有分子筛作用，常用的凝胶有聚丙烯酰胺和琼脂糖，应用最多的是前者。

聚丙烯酰胺在毛细管中聚合成为毛细管凝胶柱，通过调整两个单体的总百分浓度（T），即凝胶浓度（V/V），可以改变凝胶的孔径大小，从而对被分离组分起到分子筛的作用。这种凝胶的优点如下：①不产生吸附，消除电渗现象；②减小分子扩散，抗对流；③具有分子筛效应，迁移时间能反映出组分分子质量的大小；④在一定范围内透明，机械强度好，有弹性。聚丙烯酰胺凝胶在毛细管中的填充有交联聚合和非交联线性聚合两种方式。Widhalm 等在分析蛋白质时也采用了线性非交联聚丙烯酰胺的方法。这种凝胶的特点有：①制备简单；②毛细管可以重复使用；③凝胶-缓冲溶液体系可更换；④柱子对样品组分敏感；⑤所有类型的毛细管均可使用。当然也可以在柱中使用别的线性聚合物作为筛分介质，如甲基纤维素（methylcellulose）和 PEG。

琼脂糖凝胶（AG）在 CE 中应用最早的仍是 Hjerten。琼脂糖凝胶的孔径较大，对于分离病毒、DNA 和大分子蛋白质是很有用的。但是其中的剩余羧基和磺酸基团易引起电渗流，并且凝胶熔点约为 60℃，在散热不好时不稳定，所以重复的人很少。直到 1988 年，Compton 等才使用 AG 进行 CE 分析。1991 年，Motsch 等提出了详细的 AG 柱的制备方法，利用凝胶熔点低的特点，将 90℃ 的琼脂糖缓冲溶液注入毛细管，在室温冷却即可成胶。利用这种体系分离 DNA 内切片段和磺化二糖（sulfonated disaccharides），取得了很好的效果，并且提出了几个供以后研究的问题：①在蛋白质分离中，不同缓冲体系对柱效及稳定性的影响；②内壁的预处理；③添加剂对柱的影响；④凝胶浓度的改变对柱性能的影响；⑤AG 的稳定性；⑥温度对分离的影响以及低温下的重现性。

4）影响分离的因素

（1）毛细管长度（L）：L 在 80 cm 内，分辨率随 L 的增加而增加，但分析时间近似与 L^2 成正比增加，故不能太长，常用有效长度为 20～40 cm。毛细管内径（R）越小，电阻越大，产生的焦耳热越小，表面积体积比越大，散热越快，管内温度差越小。但表面积体积比大使管壁对样本的吸附作用增加，灵敏度减小难以检测，也极易引起毛细管堵塞，R 常为 50～100 μm。

（2）凝胶浓度：增加凝胶浓度，网格孔径变小，对组分的迁移阻力增大，可提高分辨率。但同时也会增加分离时间，减少有效分离范围。

(3) 电压(V)和缓冲液：高电压是 CGE 高效、快速的主要因素，如前所述毛细管的细内径使在高电压下不会产生过多的焦耳热。电压越高，组分迁移越快，在毛细管中时间越短，扩散越小，减少区带展宽，提高了分辨率。但高电压产生的焦耳热终究会引起管内温差变化、黏度改变，影响组分迁移区带变化。实践中用具有大缓冲容量、低离子浓度的缓冲液，如三羟甲基氨基甲烷(Tris)-硼酸来减小电流，降低焦耳热产生，毛细管用液体循环散热恒温。大容量低离子浓度的缓冲液会使毛细管管壁对样本吸附增强，需加入尿素来改性掩盖毛细管内表面电荷，削弱吸附，提高分离率，同时也减小电渗流的影响，防止强电渗流把凝胶推出毛细管。常用电压为 30～50 kV；缓冲液为 100 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 Tris-硼酸和 7 $mol \cdot L^{-1}$ 的尿素溶液。

(4) 重复性：由于温度变化引起黏度变化，不同毛细管、缓冲液 pH、浓度改变使毛细管管壁电荷不同而引起吸附作用不同。样本进样量、浓度改变及电压不稳或两缓冲液间有虹吸作用以及凝胶浓度改变引起网格结构孔径大小变化等原因常会导致迁移速度和分辨率的很大变化，重复性差。操作中采取恒温保持在±0.1℃范围内，电源稳定在±0.1%内，控制缓冲液、样本液蒸发引起浓度变化，毛细管清洗后要有充足平衡时间等相应措施纠正。

5) 毛细管凝胶电泳存在的问题

凝胶会在制备过程中因剧烈的聚合反应或者在使用过程中的高电压($>350 V \cdot cm^{-1}$)下产生一些气泡。气泡中断了电路，使柱子报废，另外，一些大的 DNA 分子的积留，也会严重影响柱寿命。孔径大小的控制一般通过凝胶浓度来实现，但通过测定孔径大小的范围对柱参数进行评价的方法仍未解决。分析重现性有待改善，这依赖于对分离条件(如电源、散热、添加剂、缓冲体系及其 pH 等)的研究和控制以及柱性能的改善。

4. 毛细管等电聚焦

毛细管等电聚焦 (capillary isoelectric focusing, CIEF)是指在毛细管中进行的等电聚焦。CIEF 是根据蛋白质的等电点(pI)不同而进行分离的。采用两性电解质混合物作为载体电解质，当在用溶质和两性电解质混合溶液充满的毛细管两端加电场时，pI 大于两性电解质混合物 pH 的溶质和两性电解质带正电，向负极移动；pI 小于两性电解质混合物 pH 的溶质和两性电解质带负电，向正极移动，当它们迁移至 pH ＝ pI 区带时，净电荷为零，不再迁移。因此，不同等电点的两性电解质在电场中从阳极到阴极按 pI 逐渐增加的顺序连续排列，从而形成稳定的 pH 梯度，梯度中每一处的 pH 将取决于该处两性电解质的 pI。同样蛋白质由于其等电点的不同而得到分离。这个过程称为等电聚焦。通过管壁涂层使电渗流减到最

小，以防蛋白质吸附及破坏稳定的聚焦区带，再将样品与两性电解质混合进样，两端储瓶分别为酸和碱。加高压(6～8 kV)3～5 min后，毛细管内部建立pH梯度，蛋白质在毛细管中向各自的等电点聚焦，形成明显的区带。最后，改变检测器末端储瓶内的pH，使聚焦的蛋白质依次通过检测器而得以确认。

毛细管等电聚焦的运行过程可分为3个步骤：

(1) 进样。把样品与两性电解质混合并进样。毛细管内充有两性电解质，一般使用合成的具有不同等电点范围的脂肪族多胺基多羧酸混合物，当施加直流电压(6～8 V)时管内将建立一个由阳极到阴极逐步升高的pH梯度。

(2) 聚焦。加高电压3～4min。氨基酸、蛋白质、多肽等的所带电荷与溶液pH有关，在酸性溶液中带正电荷，反之带负电荷。在其等电点时呈电中性，淌度为零。

(3) 迁移。阴极的缓冲液换成盐类后，一般阳极端装稀磷酸溶液，阴极端装稀NaOH溶液，再加上电压，使末端引起梯度降低，让组分一个一个通过检测器。

5. 毛细管等速电泳

毛细管等速电泳(capillary isotachor-phoresis，CITP)是一种"移动界面"电泳技术。在CITP中使用两个缓冲液系统，建立一个所有区带以相同速度移动的状态。两个缓冲液分别称为前导电解质和尾随电解质，样品加在前导和尾随电解质交界处。在CITP中各种离子以独立的区带移动，但移动速度相等，等于前导离子的移动速度。如果任何两个相邻区带中正或负离子移动速度不一样，则必然导致区带之间脱开，使脱开区缺少正离子或负离子，这是电中性原理不容许的。在分离过程中场强会自行调整以维特区带的等速移动(迁移速率＝淌度×场强)，淌度大的离子所在的区带场强较低，这种现象使各个区带间保持着明显的界面。如果一个离子扩散到另一个相邻的区带，它的迁移速率会发生变化，使其很快又回到原来所在的区带。

毛细管等速电泳特点：①将两种淌度差别很大的缓冲液分别作为前导离子和尾随离子，待测试样离子的淌度全部位于两者之间，并以同一速度移动。②负离子分析时，前导电解质的淌度大于试样中所有负离子的淌度。所有试样都按前导离子的速度等速向阳极移动，不同离子逐渐形成各自独立的区带而分离。一般在阴极进样，阳极检测。③不同离子的淌度不同，所形成区带的电场强度不同，淌度大的离子区带电场强度小。沿出口到进口，不同区带电场强度依次增大。④离子在分离过程中界面明显，具有富集、浓缩作用。

6. 毛细管电色谱

毛细管电色谱(capillary electrochromatography, CEC)是以电渗流(或电渗流

结合高压输液泵)为流动相驱动力的微柱液相色谱法。即是在毛细管中填充或在毛细管壁涂布、键合色谱固定相,依靠电渗流推动流动相,使中性和带电荷的样品分子根据它们在色谱固定相和流动相间的吸附、分配平衡常数的不同和电泳速率的不同而达到分离目的的一种分离模式,其柱结构如图 4.14 所示。毛细管电色谱是 HPLC 和 CE 的有机结合。实际上,也可以说毛细管电色谱就是用电渗流或电渗流结合压力流来推动流动相的微柱液相色谱。1981 年,Jorgeson 首次报道采用毛细管电色谱进行多环芳烃分离的研究标志着现代电色谱的开端。直到 1990 年,第一台商品化仪器才问世。毛细管电色谱借鉴了毛细管区带电泳和高效液相色谱的基本原理,在分离效能和选择性调节等方面均具有更大的优势。毛细管电色谱以电渗流替代压力降作为流动相的驱动力,有效地改善了流动相流型,使分离柱效提高。而由于电压的施加,也使得流动相及溶质在柱内输运过程的特征发生变化。

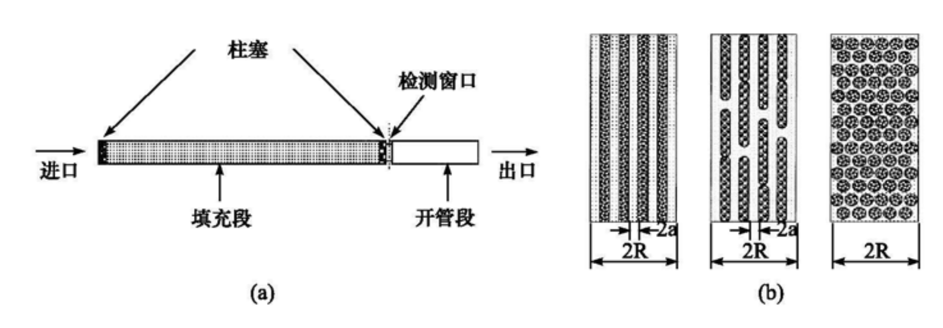


图 4.14　毛细管柱结构示意图

(a) 毛细管柱整体结构;(b) 毛细管柱内部填充方式

加压毛细管电色谱作为一种新型微分离分析技术,整合了毛细管电泳与液相色谱的优点,在填充有 HPLC 填料的毛细管电色谱柱两端施加高压直流电场,样品在毛细管色谱柱中的保留行为同时受到电渗流及其在流动相与固定相之间分配系数的影响,大大提高了样品分辨力。在双重分离机制的作用下,CEC 对于被分离样品细微之处的分辨能力得到了极大的提高,代表了分析学界高效微分离的趋势,尤其适用于复杂生物及化学体系的研究。结合毛细管柱上在线检测技术,进一步提升了检测灵敏度和检测范围。CEC 可与紫外检测器、荧光检测器、激光诱导荧光检测器、电化学检测器及质谱等多种检测手段联用,应用领域极为广泛。它克服了 CE 选择性差和分离中性物质相对困难的不足,同时也大大提高了液相色谱的分离效率,形成了自己独特的高效、微量、快捷的特点,具体有如下优点:①像高效液相色谱,能够分离不带电荷的物质;②像毛细管电泳法,在不需要压力泵系统的情况下,提供了微量体积试样溶液的高效分离,是通过电渗流泵,而不是通过机械输送流动相通过固定相的,明显地简化了输送体系;③电渗泵产生的是塞子式流

动轮廓，而不是流体动力学轮廓，因此，毛细管电色谱的分离柱效比高效液相色谱法高。

1）毛细管电色谱中的电渗流

在毛细管电色谱中，电渗流作为流动相的驱动力，直接影响到分离速度和分离效果。采用开管柱电色谱过程，电渗流的产生主要取决于毛细管内表面的双电层性质；采用填充柱的电色谱过程，电渗流的产生主要靠固定相颗粒表面形成的双电层；采用无孔、有孔或大孔固定相颗粒时，电渗流的产生机制和变化规律也有所不同。由于电色谱柱中复杂的微观结构，理论上精确地计算电渗流速度是一项复杂而又艰巨的工作。在简化的理论研究中，一般将填充柱看作一束相同内径的平行微管，每根微管的电动行为与开管柱中进行的区带电泳类似，而得到的理论结果通常能够用于定性描述电色谱中的电渗流产生机制和变化规律。为了减少因双电层重叠导致的流型改变，毛细管或通道的直径至少应大于双电层厚度的 20 倍，即大于 10，此时管道中 80％的流体由电渗流输运；当大于 20 时，电渗流输运的流体将达到 90％以上；而通道的直径大于双电层厚度的 100 倍以上，即大于 50 时，可以不考虑双电层重叠的影响，几乎 100％的流体皆由电渗流输运。

2）毛细管电色谱中影响电渗流速度的因素

① 流动相离子强度。一般情况是随离子强度增加，电渗流速度加快。

② 流动相中有机调节剂。一般有机溶剂可以降低电渗流速度。

③ pH。pH 越高，硅羟基的解离越充分，负电荷密度越大，Zeta 势也越大，导致电渗流速度也越大。

④ 柱温。对电渗流速度的影响通过改变 Zeta 势、流动相的黏度和介电常数实现。

7. 毛细管电泳分离新技术

1）微乳电动毛细管色谱

微乳液是由水、有机溶剂、表面活性剂、辅助表面活性剂所组成的油-水分散体系。在微乳电动毛细管色谱（microemulsion electrokinetic chromatography，MEEKC）中所用的微乳液是由油（有机溶剂）、乳化剂（表面活性剂和辅助表面活性剂）和缓冲溶液组成的油在水中的分散体系，即水包油（O/W）型的微乳。这种在毛细管电泳缓冲液体系中加入微乳液的分离模式，称为微乳电动毛细管色谱。

2）毛细管无胶筛分电泳

由于凝胶分离介质固有的特性，使毛细管凝胶柱的制备相当困难，而且使用寿

命较短,进样端易堵,影响了分离重现性和分析质量。为了改善分离条件,可在毛细管电泳缓冲液体系中加入水溶性高分子聚合物。这种在毛细管电泳缓冲液体系中加入水溶性高分子聚合物的分离模式,称为毛细管无胶筛分电泳(capillary non-gel sieving electrophoresis, CNGS)。

3) 非水毛细管电泳

目前,绝大多数毛细管电泳是在水溶性介质中根据样品组分淌度或分配系数的不同而进行分离的,因而常用于分离溶于水的荷电离子,而对于难溶于水的样品组分则缺乏理想的分离体系,这限制了分析物的使用范围。因此,如果采用有机溶剂作为毛细管电泳的移动介质进行电泳分离,则可以解决这个问题。这种在毛细管电泳中使用非水介质进行电泳分离的模式,称为非水溶液毛细管电泳(non-aqueous capillary electrophoresis, NACE)。NACE 由 Walbrohel 等于 1984 年首次提出,旨在解决强疏水性样品在毛细管电泳中的分析分离问题,他们以乙腈为非水溶剂分离了几何异构体喹啉和异喹啉,取得了不错的效果。目前,NACE 应用的研究热点集中在有机溶剂、电解质、检测器的选择以及方法的优化等方面。

有机溶剂的选择要根据待测物的性质和分析的要求,考虑到挥发性、介电常数、黏度、质子离解等多种因素的综合影响。甲酰胺及其衍生物是少有的几种介电常数较高、黏度较小的有机溶剂,但在使用时要注意其对人体的毒害作用,以及在紫外线区的背景吸收问题。另外,乙腈、乙酸、甲醇、二甲亚砜等都是常用到的非水溶剂。实际应用中,也常使用混合试剂,如甲醇-乙腈,能够改善溶解性,分析范围更广。

4) 毛细管阵列电泳

毛细管阵列电泳(capillary array eletrophresis, CAE)是在常规 CE 原理和技术的基础上,结合微型制造技术设计出来的一种检测技术。所使用的 CE 芯片属通道型微阵列芯片,即由微通道或反应池等构成通道型微阵列,通过加载生物样品,进行一种或连续多种反应,达到快速高效分析的目的,是一种新型的生物芯片。CAE 在高效快速的分离、高灵敏度的检测、灵活性的设计和多功能单元的集成方面的潜力已逐渐显示出来。如将 PCR 反应器集成在芯片上,可实现对 PCR 扩增的实时监测。CE 技术发展起来后,Mathies 等首次用 CE 芯片检测 DNA 突变。如今,随着微制造技术和样品处理技术的进一步发展,CAE 的检测速度和信息通量在不断成倍增加,应用范围日益广泛,可用于离子染料及多种生物样品等诸多方面。

5) 毛细管电泳免疫分析

免疫分析是建立在抗原和相应抗体之间免疫结合反应的基础上的,利用抗体(或抗原)作为选择性试剂测定抗原、半抗原(或抗体)的方法。毛细管电泳免疫分析(capillary electrophoresis based immunoassay, CEIA)这一新技术将抗原抗体的特异性识别反应,CE的高效、快速分离能力,与LIF的高灵敏度检测结合在一起,利用抗原抗体复合物与游离的抗原、抗体在电泳行为上的差异,将CE作为分离与检测手段。这种联用技术的发展为CE开拓了一个新的应用领域,也为免疫分析注入了新的活力。CEIA中所使用的免疫分析试剂主要包括示踪物与特异性抗体。要进行高效的免疫分析,必须制备均一的示踪物和抗体,不均一的示踪物会在CE分离时出现多个峰,给定量带来困难。要制备均一的示踪物,应控制抗原或抗体物质上的荧光染料结合位点。为达到这一目的,通常采用抗原决定簇代替整个抗原,或用Fab′片段代替整个抗体。抗体Fc片段上连有唾液酸,其数目的变化是导致抗体不均一性的主要原因,因此抗体经酵解产生的Fab或Fab′片段比整个抗体更适合作为CEIA中的选择性试剂。CEIA的免疫分析方法主要有以下两种:①竞争性免疫分析。将标记的抗原、一定量的抗体和待测抗原(未标记)混合温育,标记的抗原与待测抗原竞争与抗体形成抗原抗体复合物,用CE分离后LIF检测可以得到两个峰,分别代表游离的标记抗原与标记的抗原抗体复合物的量。它主要用于小分子抗原、半抗原的免疫分析。②非竞争性免疫分析。将过量的标记抗体与被测抗原混合温育,抗原与抗体结合,定量地转化为抗原抗体复合物,用CE分离后LIF检测可以得到两个峰,其中对应于抗原抗体复合物的峰可以用来定量测定样品中抗原的浓度。它主要用于大分子抗原的免疫分析。如果增加电压的变速时间还能将检测限提高1个数量级,达到1.1 $nmol \cdot L^{-1}$。

毛细管电泳虽然是电泳家族的新成员,但它的分辨效率之高、适用范围之广却不得不让人对它刮目相看。另外,由于它对组成生命体的两类大分子——核酸和蛋白质的分离功能尤为突出,已成为当今生命科学领域中一个非常重要的技术平台。除了作为主流技术帮助生物学家提前完成人类基因组的测序工作外,毛细管电泳的强大作用还将在后基因组时代得到延续。后基因组时代的主要工作内容,比如单核苷酸多态性的研究、蛋白质组学以及蛋白质与其周围分子间相互作用的研究等,在很大程度上也要得益于毛细管电泳技术平台的建立。

参考文献

[1] Carle G F, Frank M, Olson M V. *Science*. 1986, **232**: 65

[2] Lumpkin O J, Dejardin P, Zimm B H. *Biopolymers*. 1985, **24**: 1573

[3] Smith S B, Aldridge P K, Callis J B. *Science*. 1989, **243**: 203

[4] Carle G F, Olson M V. *Nucleic. Acids. Res.* 1984, **25**: 564
[5] Carle G F, Frank M, Olson M V. *Science.* 1986, **232**: 65
[6] Consden R, Gordon A H, Matrin A J P. *Biochem. J.* 1944, **38**: 224
[7] Lumpkin O J, Dejardin P, Zimm B H. *Biopolymers.* 1985, **24**: 1573
[8] Sperling K. *Electrophoresis.* 2001, **22**: 2835
[9] Klose J, Kobalz U. *Electrophoresis.* 1995, **16**: 1034
[10] Molloy M P. *Anal. Biochem.* 2000, **280**(1): 1
[11] Ewing A G, Wallingford R, Olefirowicz T M. *Anal. Chem.* 1989, **61**: 292A
[12] Rodriguez-Nogales J M, Garcia M C, Marina M L. *J. Sep. Sci.* 2006,**29**(2): 197
[13] Babu C V S, Song E J, Babar S M et al. *Electrophoresis.* 2006,**27**(1): 97
[14] Dolnik V. *Electrophoresis.* 2006, **27**(1): 126
[15] Kasicka V. *Electrophoresis.* 2006, **27**(1): 142
[16] Jorgenson J W, Lukacs K D. *Anal. Chem.* 1981, **53**: 1298
[17] Jorgenson J W, Lukacs K D. *Science.* 1983, **222**: 266
[18] Chien R L, Helmer J C. *Anal. Chem.* 1991, **63**: 1352
[19] Schwer C, Kenndler E. *Anal. Chem.* 1991, **63**: 1801
[20] Terabe S. Capillary Electrophoresis Technology. Chromatographic Science Series, Vol. 64. New York: Marcel Dekker, 1993. 65
[21] Cole R O, Sepaniak M J, et al. *J. Chromatogr. A.* 1991, **557**: 113
[22] Chiari M, Nesi M et al. *J. Chromatogr.* 1994, **680**: 571
[23] Liu Y, Pietrzyk J D. *J. Chromatogr. A.* 1998, **908**: 337
[24] Katayama H, Ishihama Y et al. *Anal. Chem.* 1998, **70**: 2254
[25] Shao X, Shen Y et al. *J. Chromatogr. A.* 1999, **830**: 415
[26] Ren X, Shen Y et al. *J. Chromatogr.* 1996, **741**: 115
[27] Chen W H, Liu C Y. *J. Chromatogr. A.* 1999, **348**: 401
[28] Klampfi C W, Buchberger W. *Trend in Anal. Chem.* 1997, **16**(4): 221
[29] Mechref Y, Ostrander G K et al. *J. Chromatogr. A.* 1997, **792**: 75
[30] Janini G M, Issaq H J et al. *J. Chromatogr. A.* 1997, **792**: 125
[31] Khaledi M G. *J. Chromatogr. A.* 1997, **780**: 3
[32] Terabe S, Otsuka K et al. *Anal. Chem.* 1985, **57**: 834
[33] Janini G M, Muschik G M et al. *J. Chromatogr. B.* 1996, **683**: 29
[34] Woolley A T, Hadley D, Landre P et al. *Anal. Chem.* 1996, **68**(23): 4081
[35] Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K et al. *Anal. Chem.* 1984, **56**(1): 111
[36] Kaneta T, Tanaka S, Taga M et al. *Anal. Chem.* 1992, **64**(7): 798
[37] Bjergegaard C, Michaelsen S, Sorensen H. *J. Chromatogr. A.* 1992, **608**(1-2): 403

第 5 章　生物质谱分析法

质谱分析法(mass spectrometry)是将化合物形成离子和碎片离子,按质荷比(m/z)的不同进行分离测定,来进行成分和结构分析的一种方法。所得结果用质谱图(也称质谱,mass spectrum)表示。根据质谱图提供的信息可以进行多种有机物和无机物的定性和定量分析、生物大分子的结构分析、样品中各种同位素比的测定及固体表面的结构和组成分析等。

生物质谱(bio-mass spectrometry,Bio-MS)是用于生物分子分析的质谱技术,而生物分子大多数以其高相对分子质量区别于其他分子,所以,与无机、有机小分子质谱只要求测定几十到 2000 的相对分子质量不同,生物质谱要求测定上万甚至是几十万的相对分子质量,因此,适用于无机、有机小分子分析的质谱技术无法用于生物大分子的分析。过去对生物大分子的质谱分析是十分困难的,随着电喷雾电离(ESI)和基质辅助激光解吸电离(MAILDI)技术的完善和成熟,生物大分子的质谱分析才得以实现。创造这两项技术的美国人约翰・芬恩(John B Fenn)和日本人田中耕一(Koichi Tanaka)为此获得了 2002 年诺贝尔化学奖。近年来,随着人类基因组计划的实施和“组学”研究日益受到重视,生物质谱在生物分子的分析方面取得了突破性的进展,其技术水平不断提高,应用面不断扩大,为生命科学等领域提供了一种强有力的分析测试手段。本章主要讨论用于生物样品分析的质谱基本理论及其在生命科学中的应用。

5.1　质　谱　仪

5.1.1　质谱仪的工作原理

质谱仪是利用电磁学原理,使带电的样品离子按质荷比进行分离的装置。离子电离后经加速进入磁场中,其动能与加速电压及电荷 z 有关,即

$$zU = 1/2mv^2 \tag{5.1}$$

$$m/z = 2U/v^2 \tag{5.2}$$

式中,z 为离子的电荷;U 为加速电压;m 为离子的质量;v 为离子初加速后的运动速度。具有速度 v 的带电粒子进入质谱分析器的电磁场中,根据所选择的分离方式,最终各种离子按质荷比(m/z)的不同实现分离。

5.1.2　质谱仪的基本结构

根据质量分析器的工作原理，可以将质谱仪分为动态仪器和静态仪器两大类。静态仪器采用稳定的电磁场，按空间位置将 m/z 不同的离子分开，如单聚焦磁质谱仪。而动态仪器采用变化的电磁场，按时间不同来区分 m/z 不同的离子，如飞行时间质谱仪和四极杆质谱仪。用于生物质谱的分析仪器属于后者。

质谱仪包括进样系统、电离系统、质量分析器和检测系统。为了获得离子的良好分析，必须避免离子损失，因此，凡有样品分子及离子存在和通过的地方，必须处于真空状态。

在进行质谱分析时，一般的过程是：通过合适的进样装置将样品引入并进行气化。气化后的样品引入到离子源进行电离。电离后的离子经过适当的加速后进入质量分析器，按不同的 m/z 进行分离。然后到达检测器，通过产生不同的信号而进行分析(图 5.1)。

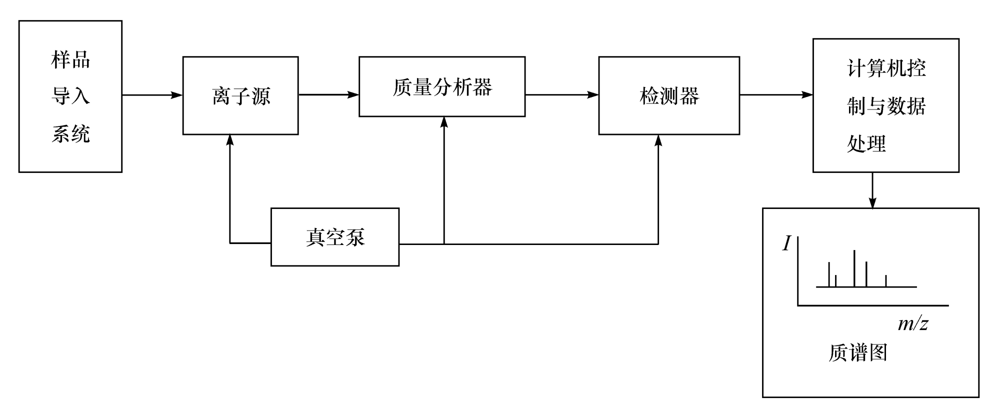


图 5.1　质谱仪的构成

1. 真空系统

质谱仪的离子产生及经过系统必须处于高真空状态(离子源真空度应达$1.3\times10^{-4}\sim3\times10^{-5}$ Pa，质量分析器中应达 1.3×10^{-6} Pa)。若真空度过低，则会造成离子源灯丝损坏、本底增高、副反应过多，从而使图谱复杂化，干扰离子源的调节、加速极放电等问题。一般质谱仪都采用机械泵预抽真空，再用高效率扩散泵连续地运行以保持真空。现代质谱仪采用分子泵可获得更高的真空度。

2. 进样系统

进样系统的目的是高效重复地将样品引入到离子源中并且不能造成真空度的

降低，而将样品导入离子源的方法决定于样品的物理性质，如熔点、蒸气压等。目前常用的进样装置有三种类型：间歇式进样系统、直接探针进样及色谱或毛细管电泳进样系统。一般质谱仪都配有前两种进样系统以适应不同的样品需要。

1）间歇式进样系统

该系统可用于气体、液体和中等蒸气压的固体样品进样，通过可拆卸式的试样管将少量（10～100 μg）固体和液体试样引入试样储存器中。由于进样系统的低压强及储存器的加热装置，使试样保持气态。实际上试样最好在操作温度下具有 0.13～1.3 Pa 的蒸气压。由于进样系统的压强比离子源的压强要大，样品离子可以通过分子漏隙（通常是带有一个小针孔的玻璃或金属膜）以分子流的形式渗透进高真空的离子源中。

2）直接探针进样

对那些在间歇式进样系统的条件下无法变成气体的固体、热敏性固体及非挥发性液体试样，可直接引入到离子源中。通常将试样放入小杯中，通过真空闭锁装置将其引入离子源，可以对样品杯进行冷却或加热处理。用这种技术不必使样品蒸气充满整个储存器，故可以引入样品量较小（要达 1 ng）和蒸气压较低的物质。直接进样法使质谱法的应用范围迅速扩大，使许多少量且复杂的有机化合物和有机金属化合物可以进行有效的分析，如甾族化合物、糖、双核苷酸和低摩尔质量聚合物等都可以获得质谱。

在很多情况下，将低挥发性物质转变为高挥发性的衍生物后再进行质谱分析也是有效的途径，如将酸变成酯、将微量金属变成挥发性螯合物等。

3）HPLC 或 CE 进样

在 LC-MS 或 CE-MS 联用技术中，经 HPLC 或 CE 分离的成分通过接口进入质谱仪，有关内容将在本章色谱-质谱联用技术一节介绍。

3. 电离源

质谱仪中产生离子的装置称为离子源（ion source）。电离源的功能是将进样系统引入的气态样品分子转化成离子。由于离子化所需要的能量随分子不同差异很大，因此，对于不同的分子应选择不同的离解方法。通常称能给样品较大能量的电离方法为硬电离方法，给样品较小能量的电离方法为软电离方法，后一种方法适用于易破裂或易电离的样品，如生物大分子。

离子源是质谱仪的心脏，可以将离子源看作是离子化反应器。样品在其中发生一系列的特征裂解反应，反应在很短时间（10^{-11} s）内发生，所以可以快速获得质

谱图。表 5.1 列出了各种离子源的基本特征。

表 5.1 质谱技术中的几种离子源

离子化方式	简称	离子化源
电子轰击离子化(electron bombardment ionization)	EI	高能电子
化学电离(chemical ionization)	CI	试剂离子
场电离(field ionization)	FI	高电势电极
场解吸(field desorption)	FD	高电势电极
快原子轰击(fast atom bombardment)	FAB	高能电子
二次离子质谱(secondary ion MS)	SIMS	高能离子
激光解吸(laser desorption)	LD	激光束
电流体效应离子化(electrohydrodynamic ionization)	EH	高场
热喷雾离子化(thermospray ionization)	TS	荷电微粒能量
电喷雾离子化(electrospray ionization)	ESI	荷电微粒能量
大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization)	APCI	气态化学反应

目前应用于生物大分子质谱分析的电离技术有基质辅助激光解吸离子化、电喷雾离子化、快原子轰击离子化、离子喷雾离子化和大气压化学电离等。这些离子化方式不产生或产生较少的碎片离子,因此,被称为软电离技术。其中,基质辅助激光解吸离子化和电喷雾离子化研究最多,应用最为广泛,下面主要讨论这两种技术。

1) 基质辅助激光解吸离子化

基质辅助激光解吸离子化 (matrix assisted laser desorption ionization,MALDI)是近 20 年发展起来的离子化技术,特别适用于蛋白质、多肽、寡核苷酸等生物大分子的离子化[1]。在 MALDI 中,引入了固体基质(尼古丁酸及其同系物),使样品液与基质液混合,滴于靶面,在真空中快速干燥,制成极细碎的混晶。当激光束打在涂有样品和基质混晶的靶面上时,基质的有机分子不是每个分子在独自状态下吸收能量、解吸、裂解、形成离子,而是在固态中共振吸收能量,并把绝大部分能量传递到基质有机物晶体的晶格中,使晶格受到瞬时强烈扰动而解吸出离子或中性分子,并通过它们将吸收的能量传递给生物大分子而使其电离[2]。在 MALDI 中,激光的能量大量消耗于晶格扰动中,并不是直接作用于生物大分子使之裂解,因此是一种非常温和的离子化方法,通常只给出分子离子(或准分子离子)峰。图 5.2 为 MALDI 工作原

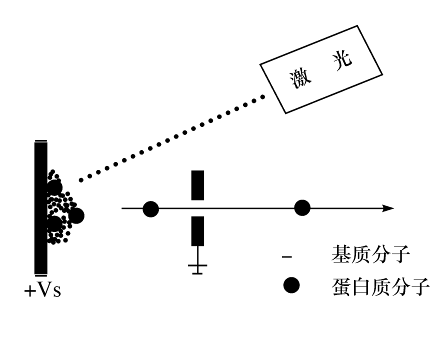


图 5.2 MALDI 工作原理图

理图。

激光光源可置于质谱仪离子源之外，只要有一个透光窗（石英窗）即可。常用的激光光源是 N_2 激光源，波长为 337 nm。由于激光在单位容积投入的能量大，易于聚焦在样品的特定表面，因此常用脉冲工作方式，因而可解吸高达几十万道尔顿的生物大分子。

MALDI-MS 通常用飞行时间（time of flight，TOF）检测器作为质量分析器，构成的仪器称为基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）。飞行时间检测器的质量分析范围大，可从几百道尔顿到 100 kDa。

MALDI-TOF-MS 分析生物大分子的关键是使用基质来实现它们的软电离[3]。基质的具体作用包括以下几方面：①从激光束吸收激光能量并转变为凝聚相的激发能，导致相崩溃（至少是样品表面分子层）；②基质对于样品分子是大大过量的，因此，基质可包围样品分子，使之相互隔离，限制聚集体的形成，避免聚集体大分子对解吸和分析的影响；③促进样品分子的离子化过程。

基质将能量传递给样品的机制很复杂，一般认为质子转移和碱金属离子加合是（准）分子离子形成的主要过程。除了（准）分子离子之外，在 MALDI-TOF 的图谱上还可见到下列离子：①在高质量区，可见到样品分子与碎片离子的加合物离子，可能是由气相离子-分子反应形成；②多电荷离子，是因大分子不同部位分别带上电荷所致；③离子化的缔合分子，是由于多肽和蛋白质分子在溶液中发生缔合作用，缔合物可能被保存下来并作为单个粒子解吸。

生物大分子，如多肽、蛋白质、核酸、多糖与寡糖等是 MALDI-TOF 最广泛应用的领域，为了获得好的分析结果，样品制备方法非常重要。在制备样品时，须注意以下几个方面：

(1) 基质的选择。

基质的种类很多，对分析结果影响很大，对于不同的分析对象应选用不同的基质。对于 N_2 激光光源，基质必须要有紫外吸收，并有可失去的 H（如没有可失去的 H，可加入少量酸）。Hillenkamp[4] 的研究表明，只有很少几类化合物能作蛋白质及其他生物大分子的基质。分析生物大分子的一些常用基质列于表 5.2。

基质必须满足一些共性：①在合适溶剂中具有良好的溶解性能。样品准备过程中基质要和蛋白质溶于同一溶剂中，因此，基质必须在一些常用蛋白质溶剂（如酸化水，水-乙氰混合物，水-乙醇混合物，70%甲酸）中溶解性好，在实际操作中基质的溶解度应达到 5 mmol · L^{-1}。②对激光具有良好的吸收性能，以使能量在基质中累积。③合适的反应活性。对蛋白质或其他分析物起共价修饰作用的基质不能采用，氧化剂由于会破坏二硫键，使半胱氨酸、甲硫氨酸基团氧化，应避免作用。醛类化合物也不适合，它们会修饰氨基酸 N 端。

有些很相似的物质有近似的溶解性及吸光性，但作为基质的性能却大不一样。

表 5.2 UV-MALDI-MS 型常用基质

基质化合物	分子质量/Da	适用范围
α-氰-4-羟基肉桂酸（α-cyano-4-hydroxycinnamic acid，HCCA）	189.04	生物高分子、糖蛋白、肽类、有机化合物、聚合物等
3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸（sinapinic acid，SA）	224.07	蛋白质、肽类、氨基酸
2,5-二羟基苯甲酸（2,5-dihydroxy benzoic acid，DHB）	154.03	200～1000Da 的有机化合物、氨基酸、肽类及糖蛋白（加入 TDA）
3-羟基吡啶甲酸（3-hydroxypicolinic acid，HPA）	139.03	约10 000Da 的聚合物、肽类、寡核苷酸、糖蛋白、糖肽及水溶性聚合物
2,4,6-三羟基苯乙酮（2,4,6-trihydroxyacetophenone，THAP）	168.00	蛋白质、肽类、氨基酸
2,6-二羟基苯乙酮（2,6-dihydroxyacetophenone，DHAP）	152.05	糖蛋白、糖肽、磷酸化肽

如 4-羟基肉桂酸是很好的基质，而 3-羟基肉桂酸却很差，但基质效果好的原因尚不清楚。有人认为它们与蛋白质有特别的亲和性，在干燥过程中蛋白质能进入固体基质，但难以测量，也难以预测。近期有关基质的研究仍很活跃，以后仍将是 MALDI 研究的一个热点。

（2）基质中所含杂质。

MALDI 与其他质谱电离源相比，对样品要求低，能耐高浓度盐、缓冲剂和其他非挥发性成分，这是 MALDI 的显著优点。但有两种杂质严重影响分析结果，为离子型去垢剂（如十二烷基磺酸钠）和低挥发溶剂（如甘油和二甲亚砜）。后者的有害作用很易解释，是因破坏样品结晶过程，或在样品-基质表面形成液膜，妨碍蛋白质离子化过程。

不同基质对杂质的允许含量不同。在质量范围 50 000Da 以上，烟酸是最好的基质，但少量的上述杂质即可使信号消失。而肉桂酸衍生物，如芥子酸和 2,5-二羟基苯甲酸（DHB）允许杂质含量高达 0.1～1 mol · L^{-1}，允许 10%的 SDS 存在，因此，可以用于分析 SDS 凝胶电泳分离的样品。

（3）样品与基质的混合比例。

高灵敏度是 MALDI 的另一显著优点，因此，样品量只需 1 pmol 甚至更少。若样品浓度大于 0.5 g · L^{-1}，基质对样品隔离作用会受影响，从而导致信号强度下降。蛋白质在基质中浓度达到 0.1 μmol · L^{-1} 时，可以获得好的信噪比图谱。质谱图所消耗实际样品量在 10^{-18} mol 级。

基质对于样品而言是大大过量的，以生物质谱常用的 DHB 为例，样品与基质的摩尔比为 1∶5000。如样品分子质量小（＜5000Da），应减少 DHB 的比例，相反，

样品的分子质量越大,DHB 的比例也应随之增加。

(4) 基质与样品是否形成共结晶对获得好的分析结果有很大影响。

结晶的方法一般是将样品-基质溶液加在样品靶上,在室温下静置,使其自然干燥,以长成大结晶。这样长成的结晶靶面“不均匀”,往往存在“热点”,在此处测定的灵敏度、分辨率、准确度较高,而且在同一点可反复得到信号,有时可作上百次测定。也可以借助于热气流或真空使溶剂迅速挥发,这种方式长成的是细结晶,靶面比较“均匀”,各部位产生的信号差异较小。还可用“两步样品制备法”,即在样品靶上先加上一层基质,迅速使其干燥(有时还可将覆盖在表面的基质细结晶压碎并使之分布在整个基底的表面),再将样品-基质溶液加在其上,也可得到较“均匀”的靶面。

(5) 有时,在基质中加入少量碳水化合物(如 D-葡萄糖、D-核糖、D-果糖、D-岩藻糖等)可增加分析物稳定性,提高分辨率。这可能是由于激光轰击样品表面时,碳水化合物发生分解,瞬间产生的中性气体使供试品分子冷却的缘故。

MALDI 产生的大质量离子检测较困难,这些离子质荷比很大,在离子源中速度不高,必须转化为电子以便检测。大质量离子的速度常低于碰撞诱导激发电子漂移的临界值,使离子的检测效率低。其质量检测上限取决于检测器,因此,必须发展高效检测器。目前 MALDI-TOF 质量检测的范围已超过 300 000 Da,一些生物大分子如尿素酶(271 000 Da)、二聚体分子离子(345 000 Da)、触酶分子(236 230 Da)已被成功检测。质量测定通常用精确测量过的化合物作参比,既可用内标法也可用外标法(详细内容见第 11 章)。

图 5.3 是肌钙蛋白 MALDI 质谱图,从图中可以看到基质峰较小,而其分子离子峰$[M+H]^+$和$[M+2H]^{2+}$峰对应的 m/z 分别为 18 010.1 和 9005.3。

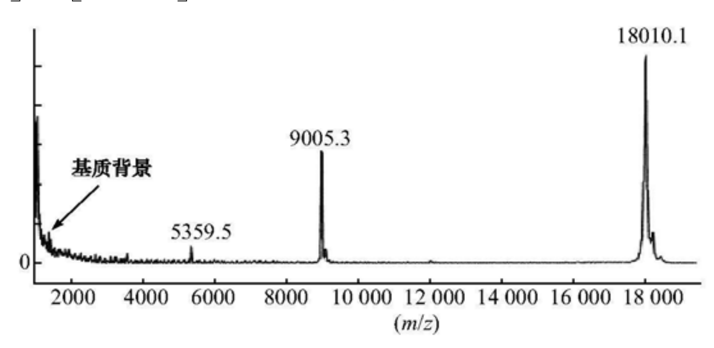


图 5.3　肌钙蛋白 MALDI 质谱图

MALDI-TOF 谱图中,主要信号是完整的分子离子峰,因此,单电荷分子离子峰占主要地位。随着分析量增加,双电荷离子相对丰度增加,并出现多电荷离子。基质信号出现在低质量范围(500～1000 Da),它们有准分子离子和一些特别碎片

峰,还有光化学反应产生的加合离子。不同基质在低质量区出现分子离子信号的强度不同,条件好时甚至不出现基质峰。

在 MALDI-TOF 质谱中,蛋白质的质子化正离子和去质子化负离子都可检测,正离子谱和负离子谱强度相似。从质子化分子上丢失小的中性分子(如 H_2O, NH_3, HCOOH)所获得的碎片离子通常较弱,且大分子质量蛋白质和小肽裂解方式不同,大蛋白质通常丢失一些小的中性基团,并给出一些低强度不易解释的碎片峰,而小肽通常发生骨架裂解。准分子离子峰在高质量区常伴随一些分析物与基质的加合离子峰,这种现象随蛋白质分子质量的增加而明显。这些加合离子可能是光化学作用产物,强度因基质而异。

2) 电喷雾离子化

电喷雾电离是在液滴变成蒸气产生离子发射过程中形成的。20 世纪 60 年代 Malcolm Dole 用电喷雾电离分析了高分子聚合物,80 年代美国耶鲁大学 John Fenn[5] 报道了用电喷雾离子化-质谱图首次成功地进行蛋白质分析,并为此获得 2002 年诺贝尔化学奖。

电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI)是一种"软电离"方式,它是在"离子蒸发"的原理基础上发展起来的一种离子化方法。离子蒸发是指离子从液相发射到气相的过程。待测分子溶解在溶剂中,以液相方式通过毛细管到达喷口,在喷口高电压作用下形成带电荷的微滴,随着微滴中的挥发性溶剂蒸发,微滴表面的电荷体密度随半径的减少而增加,到达某一临界点时,样品将以离子方式从液滴表面蒸发,进入气相。这一过程即实现了样品的离子化,由于没有直接的外界能量作用于分子,因此对分子结构破坏较少,是一种典型的"软电离"方式。电喷雾离子化示意图见图 5.4。

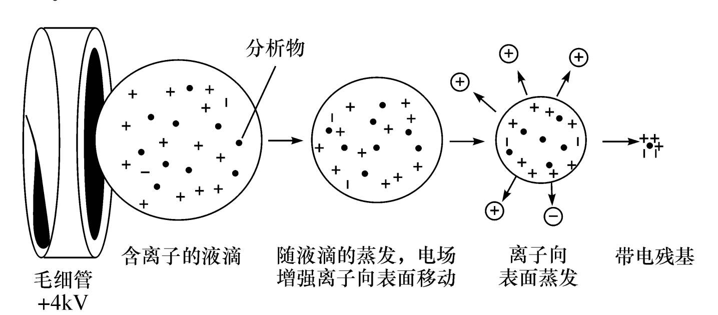


图 5.4 电喷雾电离原理示意图

电喷雾质谱的另一大特点是可形成多电荷离子,因此,在较小的 m/z 范围内可以检测到大分子质量的分子。电喷雾质谱目前可测定分子质量在 100 000 Da

以下的蛋白质，最高达150 000 Da。由于离子蒸发使电喷雾质谱以液相方式进样，因此，ESI可与蛋白质化学中常用的分离方法（如液相色谱和毛细管电泳）联用，即液相色谱-电喷雾质谱（LC-MS）和毛细管电泳-电喷雾质谱（CE-MS）。蛋白质或多肽经过HPLC和CE分离后，直接进入质谱进行分子质量测定。

ESI-MS既可分析大分子也可分析小分子，对于分子质量在1000 Da以下的小分子，会产生$[M+H]^{+}$或$[M-H]^{-1}$离子，选择相应正离子或负离子进行检测，就可得到物质的分子质量。分子质量高达20 000 Da的大分子在ESI-MS中生成一系列$[M+nH]^{n+}$多电荷离子（n为质子化数，即电荷数），通过数据处理系统能够得到样品的分子质量，准确度优于±0.01%。

这些离子（m/z）以“表观”质量数出现在质谱图上，与分子质量的关系如下式所示：

$$\frac{M+nH}{n}=\frac{m}{z} \tag{5.3}$$

式中，M为真实质量；n为电荷数；H为质子的质量。ESI这种特征能有效地扩大质谱仪的质量范围。

通常，任一特定离子的电荷数是未知的，但在一个多电荷离子系列中，任何两个相邻离子只相差一个电荷，所以在质谱图上相邻两个峰质量若以M_1和M_2表示，则：

$$n_1=n_2+1 \tag{5.4}$$

式中，n_1为M_1的电荷数；n_2为M_2的电荷数。由式(5.3)可知：

$$M_2=\frac{M+n_2H}{n_2} \tag{5.5}$$

$$M_1=\frac{M+n_1H}{n_1} \tag{5.6}$$

由式(5.4)，(5.5)和(5.6)分别得到

$$n_2M_2=M+n_2H \tag{5.7}$$

$$(n_2+1)M_1=M+(n_2+1)H \tag{5.8}$$

解上述联立方程得

$$n_2=(M_1-H)/(M_2-M_1) \tag{5.9}$$

$$M=n_2(M_2-H) \tag{5.10}$$

n_2值为最接近的整数。

例如，心肌红蛋白样品（相对分子质量16 952.48）生成的正离子ESI谱图中出现一系列m/z 700～2400多电荷离子（图5.5）。该谱图是用质量范围为4000Da的质谱仪测得。若样品只形成单电荷离子，它的分子质量就超出了仪器的可测量范围。分子质量既可用上述方程式计算，也可用下面简便方法计算：

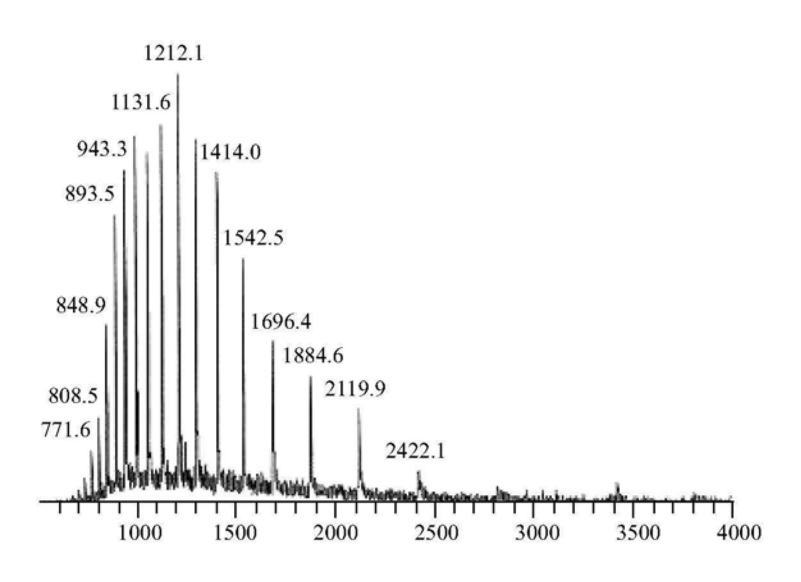


图 5.5　心肌红蛋白 ESI-MS 质谱图

获取二相邻质谱峰，如质荷比为 1414.0 和 1542.5 二峰，

若　　$1414.0=[M+nH]/n$

则　　$1542.5=[M+(n-1)H]/(n-1)$

由　　$nH \ll M$

得　　$1414.0n=M$

同时　　$1542.5(n-1)=M$

解上述方程式可知 $M=16\ 955.91$ Da

由软件可计算出 n 和 M 值，从而预测同一系列中其他多电荷离子。M 值是同一系列中每对峰在标准偏差范围内计算的平均值。当然也可采用其他处理技术，如将 m/z 谱图转化为分子质量的分布，从中读出准确的质量数（$+0.01\%$），或用最大熵值方法得到最佳分辨率。ESI-MS 通过多电荷离子已能测出分子质量达 133 000 Da 的蛋白质或分子质量达 200 000 Da 的糖蛋白（glycoprotein）。ESI 一般用于四极杆质谱仪，也可安装在磁质谱仪及离子回旋共振谱仪上，谱上的多电荷离子是多个质子络合的离子，络合的质子数目可高达 100 多个。

ESI-MS/MS 或 HPLC/ESI-MS 联用可进行蛋白质序列分析，ESI-MS 在蛋白质构象分析、酶反应中间体分析、酶抑制剂机制分析、共价或非共价复合体分析等方面均获得了应用，质量范围为 1000～2400 amu 的质制谱仪，用 ESI 可测得百万道尔顿分子质量的蛋白质。

常规电喷雾在喷雾时形成的较大液滴中，有一部分样品还来不及离子化，因而降低了样品的利用率和灵敏度。近年发展的纳升电喷雾方法（nanospray），用内径

1μm左右的喷针,样品注入到喷针的喷口,产生喷雾,在喷口前端喷雾液滴体积是常规电喷雾的 1/100,使样品被充分利用并有效离子化。纳升电喷雾以极低的流速(20～40 nl · min^{-1})消耗极少的样品(1～2 μl),灵敏度达 fmol 级。

有许多因素影响 ESI,从而影响样品离子信号:①样品的 pK_a 和溶液的 pH。样品离子取决于样品在喷雾溶液中是否形成离子。在正离子检测中,溶液 pH 应较低,而在负离子检测中,pH 应较高。②溶剂的性质。用于 ESI 的溶剂应能使样品在溶液中形成离子,具有较低的溶剂化能力以利于离子蒸发,具有较低的黏度和表面张力以利于雾化以及具有较低热容量以利于溶剂化。

4. 质量分析器

质谱仪的质量分析器(mass analyzer)位于离子源和检测器之间,依据不同方式将样品离子按质荷比 m/z 分开。质量分析器的主要类型有:磁分析器、飞行时间(time of flight,TOF)分析器、四极滤质器、离子捕获分析器和离子回旋共振分析器等。随着电子技术的发展,也可以采用这些分析器的变型。用于生物大分子质谱分析的质量分析器主要是后面四种。

1) 飞行时间分析器

这种分析器的离子分离是用非磁方式达到的[6],按照仪器的构造不同,又可分为线性飞行时间质量分析器和反射飞行时间分析器。在线性飞行时间质量分析器中,因为从离子源飞出的离子动能基本一致,在飞出离子源后进入一长为 D 的无场漂移管,离子加速后的速度为 v,则在离子达到无场漂移管另一端的时间就为 D/v, 见图 5.6。

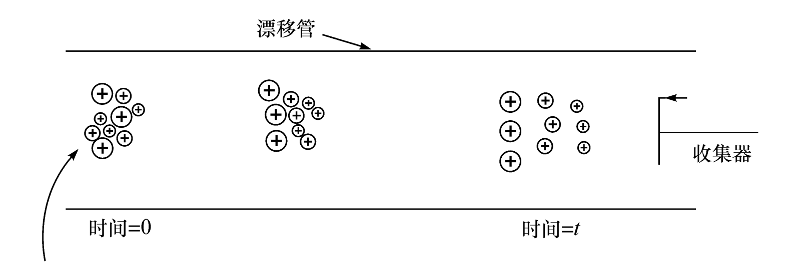


图 5.6　线性 TOF 原理

所有进入漂移区的离子具有相同的动能(E):

$$E = qE_s \tag{5.11}$$

式中,$q = Ze$ 为离子的总电荷;E_s 为加速电压。

$$qE_s = \frac{1}{2}mv^2 \tag{5.12}$$

式中，m 为离子的质量；v 为飞行速度。

离子在漂移区内所需的时间为

$$t = D/v \tag{5.13}$$

以式(5.1)中的 v 代入式(5.13)可得

$$t = [m/(2ZeE_s)]^{1/2} D \tag{5.14}$$

整理式(5.14)为

$$m/Z = 2eE_s(t/D)^2 \tag{5.15}$$

或者 $m = At^2$，式中 A 为常数。所以，测定离子在漂移区内的飞行时间即可计算出它的质荷比，亦即离子的飞行时间谱可转化为质谱图[6]。

因为连续电离和加速将导致检测器的连续输出而无法获得有用信息，所以TOF以大约10kHz的频率进行电子脉冲轰击法产生正离子，随即用一具有相同频率的脉冲加速电场加速，被加速的粒子按不同的 m/z 的时间经漂移管到达收集极上，并馈入到一个水平扫描频率与电场脉冲频率一致的示波器上，从而得到质谱图。用这种仪器，每秒钟可以得到多达1000幅的质谱。

线性飞行管的MALDI-TOF-MS的质量分辨和测量准确度不高，测量误差在20%左右，不能满足蛋白质分析的需求。为了改变仪器的分辨率和质量测量准确度，在仪器的飞行管道内加了一个反射电场，称为离子镜(ion mirror)或反射器(reflector)，构成的仪器称为反射飞行时间质谱(RETOF-MS)。反射电场起了能量聚焦作用，即具有相同质荷比但能量有细微差异的离子在反射电场作用下飞行时间达到一致，同时离子改变了飞行方向，延长了飞行距离，所以反射飞行时间质谱(RETOF-MS)的分辨率和质量测量准确度都有了很大提高。为了使离子能够转向并飞到反射检测器，反射电场的电压要大于加速电场的电压。反射检测方式只能分析质量数10kDa以下的离子。

具有反射飞行时间分析器的MALDI-TOF-MS可以分析源后衰变(post-source decay，PSD)产生的亚稳离子，这是一种串联质谱分析，可获得离子的结构信息。源后衰变即MALDI源产生的离子(母离子)在飞行管道飞行过程中发生裂解，丢失部分中性碎片，剩余的离子片段(子离子)成为质量减少、飞行速度不变(即动能减少)的亚稳离子。母离子和子离子在反射电场中的通过时间不同，由于两者速度相同，质量较小，即动能较小的离子通过时间较短，这个时间与离子质量成正比，与反射电场的电压成反比。在正常分析母离子时，子离子不能进入反射检测器。为了分析子离子，在实际操作中，通过逐步减少反射电场电压的方式检测子离子。PSD谱图通常由10到20个不同反射电压下的谱图叠加而成，为了覆盖质量在母离子质量的10%～100%的子离子，反射电场电压要下降到原反射电压的10%。

从分辨本领、重现性及质量鉴定来说，TOF不及其他质量分析器，但其快速扫

描质谱的性能，使得此类分析器可以应用于研究快速反应以及与 GC 联用等，而且 TOF 质谱仪的质量检测上限没有限制，因而可用于高质量离子分析。与磁场分析器相比较，TOF 仪器的体积较小且易于移动与搬运，操作起来比较方便。

2）四极滤质器

四极滤质器(quadrupole mass filter)由 4 根平行的金属杆组成，其排布如图 5.7 所示。理想的四杆为双曲线，但常用的是 4 支圆柱形金属杆，被加速的离子速穿过对准四极杆之间空间的准直小孔[7]。

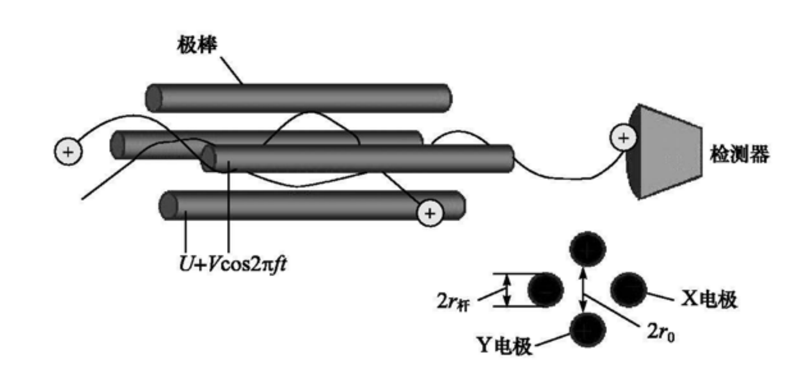


图 5.7　四极杆质量分析器

四级质谱仪结构很简单，它是由两对相互平行的横截面为双曲面或圆形的极杆所组成，在此极杆上加上两对极性相反的电位 $\pm\phi_0$ 形成四极场。当离子沿 z 轴进入四极场后将受到此电场的作用，在四极场中无空间电荷即理想场情况下，在场中任何一点(x, y, z)的电位可用下式表示：

$$\phi_{x,y,z} = \frac{\phi_0}{r_0^2}(\lambda x^2 + \sigma y^2 + \gamma z^2) \tag{5.16}$$

ϕ_0 是加在极杆上的电位，

$$\phi_0 = U - V\cos\Omega t \tag{5.17}$$

式中，U 是直流电位；$V\cos\Omega t$ 是射频电位(RF)；V 是射频电位的幅值；Ω 为角频率且 $\Omega = 2\pi f$；λ，σ 和 γ 分别为 x，y，z 方向上的权重常数(weighting constant)。因为场内电场梯度是均一的，所以满足 Laplace 方程 $\nabla^2\phi = 0$，即

$$\nabla^2\phi = \frac{\partial^2\phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\phi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\phi}{\partial z^2} = 0 \tag{5.18}$$

从(5.16)式可得

$$\nabla^2\phi = \frac{\phi_0}{r_0^2}(2\lambda + 2\sigma + 2\gamma) \tag{5.19}$$

要满足(5.18)式，则 $\lambda+\sigma+\gamma=0$ 或 $\phi_0=0$，这些条件在四极场中必须得到满足。在四极杆质谱中，$\lambda=-\sigma=1$，$\lambda=0$。在离子阱中，$\lambda=\sigma=1$，$\lambda=-2$。

在此场内，离子在 x，y，z 方向上的运动方程($F=ma$)分别由下式表示

$$F_x = ma_x = m\frac{d^2x}{dt^2} = -e\frac{\partial\phi}{\partial x} \tag{5.20}$$

$$F_y = ma_y = m\frac{d^2y}{dt^2} = -e\frac{\partial\phi}{\partial y} \tag{5.21}$$

$$F_z = ma_z = m\frac{d^2z}{dt^2} = -e\frac{\partial\phi}{\partial z} \tag{5.22}$$

式中，a 为离子的加速度；m 为离子的质量。以 x 方向上离子的运动方程为例，对(5.16)式微分得

$$\frac{\partial\phi}{\partial x} = \frac{2\lambda x}{r_0^2}(U - V\cos\Omega t) \tag{5.23}$$

把式(5.23)代入(5.20)式得

$$F_x = m\frac{d^2x}{dt^2} = -\frac{2\lambda x}{r_0^2}(U - V\cos\Omega t) \tag{5.24}$$

整理式(5.20)可得

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2\lambda x}{mr_0^2}(U - V\cos\Omega t) = 0 \tag{5.25}$$

令 $\xi=\frac{\Omega t}{2}$则

$$\frac{d}{dt} = \frac{d\xi}{dt}\frac{d}{d\xi} = \frac{\Omega}{2}\frac{d}{d\xi},\ \frac{d^2}{dt^2} = \frac{d\xi}{dt}\frac{d}{d\xi}\left(\frac{d}{dt}\right) = \frac{\Omega^2}{4}\frac{d^2}{d\xi^2} \tag{5.26}$$

将(5.26)式代入(5.24)式可得：

$$\frac{m\Omega^2}{4}\frac{d^2x}{d\xi^2} = \frac{-2\lambda e x}{r_0^2}(U - V\cos\Omega t) \tag{5.27}$$

两边同乘$\frac{4}{m\Omega^2}$，

则 $$\frac{d^2x}{d\xi^2} = -\frac{8\lambda e xU}{mr_0^2\Omega^2} + \frac{8\lambda e xV\cos 2\xi}{mr_0^2\Omega^2} \tag{5.28}$$

令 $a_x=\frac{8\lambda eU}{mr_0^2\Omega^2}$，$q_x=\frac{4\lambda eV}{mr_0^2\Omega^2}$并代入(5.28)式可得

$$\frac{d^2x}{d\xi^2} + (a_x - 2q_x\cos 2\xi)x = 0 \tag{5.29}$$

同样，对四极场中任何一个方向的运动方程也可用(5.29)式的形式来表示：

$$\frac{d^2 u}{d\xi^2}+(a_u-2q_u\cos 2\xi)u=0 \tag{5.30}$$

其中，

$$a_u=\frac{8eU}{mr_0^2\Omega^2},q_u=\frac{4eV}{mr_0^2\Omega^2} \tag{5.31}$$

式中，u 代表 x、y、z 坐标；ξ 是无量纲参数，且 $\xi=\frac{\Omega t}{2}$。(5.30)式即是著名的马绍方程(Mathieu equation)，它是描述离子在四极场中运动规律的基本方程。我们所关心的并不是如何解马绍方程，而是离子在场中沿 z 方向注入后能否依次通过四极杆得到分离并检测，即离子在场中的运动轨道是否稳定，它在 x 与 y 方向上的振幅是否小于极杆之间的间距($2r_0$)，亦即由 U、V、m、r_0、Ω 这些参数所决定的 a_u、q_u 值能否使马绍方程有稳定的解。通常马绍方程是否有稳定的解由以 a_u、q_u 为坐标的稳定图来表示(图 5.8)。

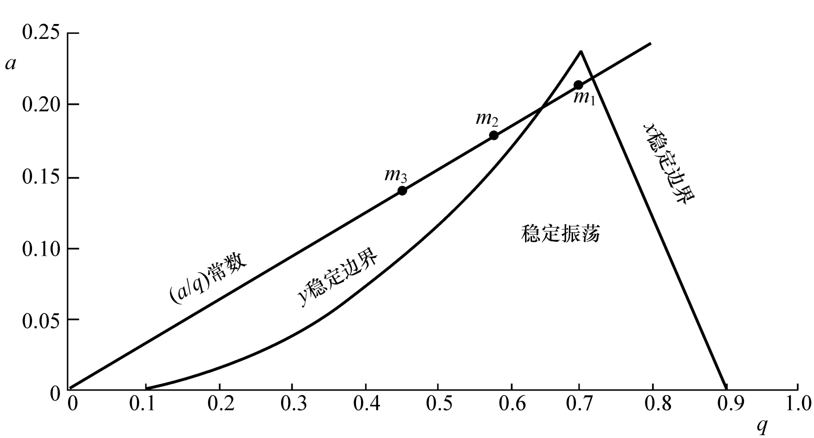


图 5.8　四极杆稳定图

四极质谱仪的质量测量上限范围为 2000～4000Da，分辨率为单位质量分辨，属于低分辨仪器。四极滤质器分辨率和 m/z 范围与磁分析器大体相同，极限分辨率可达 2000，典型的约为 700。其主要优点是传输效率较高，入射离子的动能或角发散影响不大；其次是可以快速地进行全扫描，而且制作工艺简单，仪器紧凑，常用在需要快速扫描的 GC-MS 及空间卫星上进行分析。

3）离子阱

离子阱 (ion trap)是一种通过电场或磁场将气相离子控制并储存一段时间的装置。已有多种形式的离子阱被使用，但常用的只有两种形式，一种是后面要讲到的离子回旋共振技术，另一种是下述的较简单的离子阱。

图 5.9 是离子阱的一种典型构造及示意图，离子阱质谱结构与四极杆质谱相似，由一个环电极(ring electrode)和两个端盖电极(endcap electrode)组成，它们的横截面均为双曲面，环电极上的电位为 ϕ_0，端盖电极接地，对于理想的四级场其电极尺寸 $r_0^2=2z_0^2$。在此条件下，场中任何一点(x, y, z)上的电位仍可用(5.16)式表示[8]。

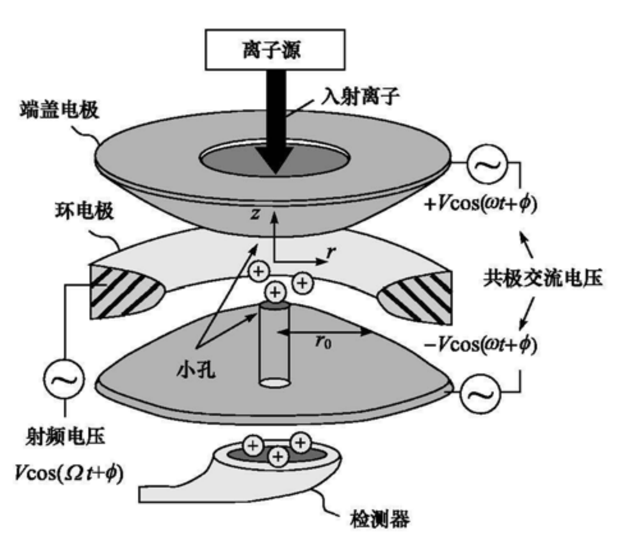


图 5.9　离子阱分析器

如前所述，为满足 Laplace 方程的条件，$\lambda=\sigma=1$，$\lambda=-2$，所以四极离子阱电场的表达为

$$\phi_{x,y,z}=\frac{\phi_0}{r_0^2}(x^2+y^2-2z^2) \tag{5.32}$$

离子阱以 z 轴为对称轴，所以通常用 r、z 两个方向来表达。

令 $x=r\cos\theta$，$y=r\sin\theta$，$z=z$，并代入(5.32)式，则可变换为

$$\phi_{r,z}=\frac{\phi_0}{r_0^2}(r^2\cos^2\theta+r^2\sin^2\theta-2z^2)=\frac{\phi_0}{r_0^2}(r^2-2z^2) \tag{5.33}$$

考虑四极离子阱电极上的电位，即环电极($z=0$，$r=r_0$)上的电位 $\phi=\phi_0$ 及端盖电极($r=0$，$z=z_0$)上的电位为 $\phi=0$，所以式(5.33)按上述边界条件可修正为

$$\phi_{r,z}=\frac{\phi_0}{2r_0^2}(r^2-2z^2)+\frac{\phi_0}{2} \tag{5.34}$$

参照四极质谱中离子运动方程推导过程，也可得到描述离子阱中离子运动的马绍方程：

$$\frac{d^2u}{d\xi^2}+(a_u-2q_u\cos 2\xi)u=0,\mu(r,z) \tag{5.35}$$

其中，

$$a_r = \frac{4eV}{mr_0^2\Omega^2},\qquad q_r = \frac{-4eV}{mr_0^2\Omega^2} \tag{5.36}$$

$$a_z = \frac{-8eU}{mr_0^2\Omega^2},\qquad q_z = \frac{4eV}{mr_0^2\Omega^2} \tag{5.37}$$

与四极质谱一样，由 a_z、q_z 所决定的方程是否有稳定的解，也用稳定图来表示。如上所述离子阱在正常操作条件下，端盖电极接地，环电极上只有射频电位 $U=0$，即 $a_z=0$，可见离子的"运动"均在 q_z 轴上进行。设想离子阱在起始时环电极加上射频电位幅值为 V_0，从式(5.38)可计算出不同质量的离子的 q_z 值。凡是其 q_z 值在 0～0.908 之间的离子均被稳定地陷在离子阱中，由于 q_z 与 m 成反比，所以质量大的离子 q_z 小，相反亦然。当射频电位的幅值从 V_0 逐渐升高时，不同质量的离子的 q_z 值也随之逐渐增大，也就是说它们按质量从小到大的次序沿着 q_z 轴向左移动，当离子的 q_z 值大于 0.908 时，离子在 z 向的振幅变大，运动不稳定并通过端盖电极上的小孔打到倍增器上被检测，以此得到一张完整的质谱图。这种操作模式称为选择质量不稳定模式(mass-selective instability)，是离子阱通常使用的操作模式。

离子阱技术从早期离子阱检测器(ion trap detector，ITD)发展到离子阱质谱(ion trap mass spectrometry)，它的主要技术性能(如分辨率、质量测量范围和质谱-质谱功能)都得到了发展和提高，这也是采取了以下一系列技术措施的结果。

(1) 缓冲气(buffer gas)。

离子阱充入一定量的惰性气体如氦气(10^{-3} torr)后，离子和氦原子将发生碰撞，使离子的动能得到一定程度的"冷却"，从而使离子在 r、z 方向上的位移趋向离子阱的中心。当这些离子达到轨道不稳定的临界状态时，它们几乎在离子阱内同样的位置开始向外运动，由于离子不仅成群结队地向外运动，而且都紧紧地沿着 z 轴方向聚焦，所以提高了仪器的分辨率和灵敏度。

(2) 自动增益控制(auto gain control，AGC)。

当样品在离子阱中的浓度发生变化时，不论是否有缓冲气的存在，谱形仍会发生变化，致使定量分析无法进行，谱库检索无法实现。这是由于高浓度的样品分子如果在离子阱中陷入较长时间将会发生分子离子反应，从而改变离子的特征。如分子离子变成了准分子离子，造成定量分析困难。另外，离子阱中离子密度的增加也会引起空间电荷效应(space-charge)，由于它改变了"纯"四极场的性质，其结果将造成稳定图边界位置的改变，从而使离子质量发生偏离。为了克服上述缺点，采用了自动增益控制技术，即在扫描过程中设有两个电离时间段，第一电离阶段的时间为固定的，如 0.2 ms，电离后赶出全部从背景气中形成的离子(如 m/z 为 44 以下)并测定保留在阱内的离子的总离子流，以此作为依据计算第二阶段电离所需的

最佳时间,这样可以避免因阱内离子太多而引起的空间电荷效应。当然在第一次扫描过程中都同时伴有这两个时间段的电离过程,其电离时间与谱的强度也同时被记录,以便实现数据的一化处理。由于自动增益控制技术的应用,离子阱质谱也可实现定量分析。

(3) 轴向调制(axial modulation)。

当离子阱中的射频电位幅值扫描时,低质量离子首先被“扫出”离子阱,而较高质量离子仍旧陷在阱中,由此引起的空间电荷效应将会造成即将被扫出的离子峰的加宽。为了改变这种状况,在端盖电极上加上一个附加振荡电场(oscillation field),它的峰值为 $6V_{(p-p)}$,频率约为环电极上射频电位频率的一半。当离子随着射频电位幅值的增加而达到稳定三角形边界(q_z=0.908)即将被扫出时,在附加振荡电位的作用下,这些离子将产生共振,并紧密地聚集在一起,同时排出离子阱,所以分辨率随之得到提高。

(4) 质量范围的扩展。

离子阱质谱最初设计的质量范围仅为 650Da,显然不适合于生物大分子的分析。从方程 $m/e=\frac{4V}{r_0^2\Omega^2 q_z}$ 中可见,减少电极尺寸 r_0 或降低射频电位的频率 Ω,均可扩展质量范围,然而最有效的办法是采用共振排斥法(resonance ejection)。即在 q_z 轴上开一个小孔,让离子在此孔的位置上发生共振排斥。其具体操作过程如下:当射频电位幅值扫描,即在 q_z 扫描时在端盖电极上加上一个频率较低的附加交流电位,它的频率由质量范围扩大的倍数决定。阱内离子随着射频电位的幅值的增大其 q_z 也增大,当达到设定的共振斥点所相应的 q_z 值时,离子依次产生共振并排出离子阱到达检测器。由于 m/z 值与 q_z 成反比,所以共振排斥点的 $q_{z\text{-new}}$ 可用下式表示:$q_{z\text{-new}}=q_{z\text{-eject-old}}\left(\frac{m/z_{\text{lim-old}}}{m/z_{\text{lim-new}}}\right)$,当欲扩大的质量范围即$\left(\frac{m/z_{\text{lim-old}}}{m/z_{\text{lim-new}}}\right)$确定后,$q_{z\text{-new}}$即可由上式计算得到。通过 q_z 与 β_z 的关系式(见后),β_z 即离子阱端盖电极上的附加交流电位的频率也可决定,如需扩大质量范围为 10 倍,则 $q_{z\text{-new}}$=0.908/10=0.0908,相应的 β_z=0.064,此时在端盖电极上应附加的交流电位的频率为 35.2kHz。

(5) 狭扫描(narrow scan or zoom scan)。

通常离子阱的扫描速度为 5555Da/s,当质量范围为 650Da 时,此扫描速度相当于 180μs/Da。在这种扫描速度下,以质量选择不稳定模式工作时,对单电荷离子的分辨率(半峰宽定义)理论上可达 3m。离子阱的分辨率除了由它本身的性能决定外,还取决于控制射频电位变化的电子线路中数字模拟转换器(DAC)的速度。在仪器设计中一般将此 DAC 所需的时间间隔等同于离子流信号采集时模拟数字转换器(ADC)的时间间隔,以 12 位(bit)的 DAC 和 ADC 为例,此时间间隔为

28μs,由此可得每一个质量中的采样次数为 180μs /28μs,即约 6.3 次。若采用上述的质量扩展技术,使质量范围扩展至 4100 Da,则每一个质量中的采样数至少 6 次才能较完整地表达一个峰的原来面貌。如果采样次数太少,峰形将发生变化,使原来两个能相互分离的峰合并成一个峰。

(6) 质谱/质谱(MS^n, $n \geqslant 10$)。

生物大分子分析中,特别是蛋白质、多肽分析中,质谱/质谱功能是必不可少的技术手段。因为肽段的 MS/MS 所提供的各级子离子信息包含了极为丰富的 N 端和 C 端离子结构信息(即 b、y 系列)离子,不仅为实现计算机数据库检索创造了良好的条件,也为多肽的 de novo 序列分析提供了所必需的信息。

在离子阱中实现 MS/MS 的关键在于如何提取先驱离子(precusor ion),即把质量大于或小于此离子的离子赶出离子阱。实现提取单一离子的方法很多,下面仅做简单介绍。

① 顶点提取法(apex isolation)。

此方法是采取射频电位和直流电位相结合的方法,首先使提取离子从 A 点移到三角形的顶点在 q_z 轴上的投影点 B,然后在环电极上加一个负的适当大小的直流电压($-U$),使该离子的 $q_z>0$,并恰好到达在三角形顶点之下的 C 点。在此条件下,质量比提取离子大或小的离子分别越过 $\beta_r=0$ 与 $\beta_z=1$ 边界线,由于在 y 向和 z 向不稳定而被消去。

② 共振排斥(resonance ejection)。

共振排斥法原理如前所述,这里不再重复。运用共振排斥法实施离子提取时端盖电极上的附加电场的频率不是固定的,而是以提取离子质量的不同而改变的。通常此频率设定在相当于提取离子质量数加 1 的水平。当离子形成后(A),射频电压立即起始扫描(B),同时端盖电极加上附加电场,此时小于提取离子质量的离子随着射频电位幅值的增加在 $\beta_z=1$ 边界上由于 z 向不稳定而被排出离子阱,大于提取离子质量的离子由于与附加电场的频率发生共振而同样被排出离子阱,只有提取离子能留在离子阱中。

③ 过滤噪声场法(filtered noise field)。

运用此方法时先在环电压上加上射频电位,使一定质量范围内的离子均陷于阱中,其中包括欲提取的离子,与此同时在端盖电极上加上附加振荡电位,其频率覆盖上述质量范围内所有离子的在 z 向的振荡频率而独缺一个相应于提取离子的频率。因此,大于或小于提取离子质量的所有离子均因共振而被排出离子阱,唯有提取离子被留在阱内。

在离子提取技术的发展和应用上,Cooks、Kelley、Mclucky 等做出了很大的贡献,他们分别采用逆向傅里叶转换的尖脉冲、陷波滤波技术,以及反向-正向扫描等方法,达到了有效的提取单一离子并实现了质谱/质谱测试功能,有关这些技术的

详细内容在此不一一赘述。

用以上这些方法得到的离子,在阱内经共振激发与背景气体发生相互碰撞并发生单分子裂解反应,然后以通常射频电位幅值的扫描得到子离子图谱。重复上述的过程,即可在离子阱质谱中实现多级 MS/MS 功能。目前商品仪器中最多可达 10～11 级。

在以上讨论离子阱的性能改进过程中,共振排斥、轴向调制技术被广泛应用,这些技术的基本原理均是在端盖电极上加上一个附加的振荡电位,使其与不同离子发生共振,所以,离子的基本频率是离子阱中一个重要参数。它是由下式决定的:

$$\omega_{u,n}=\left(n+\frac{1}{2}\beta_u\right)\Omega \qquad 0\leqslant n\leqslant\infty$$

$$\omega_{u,n}=-\left(n+\frac{1}{2}\beta_u\right)\Omega \qquad -\infty\leqslant n\leqslant 0 \tag{5.38}$$

当 $n=0$ 时,称此为离子的基本频率,即 $\omega_{u,0}=\frac{1}{2}\beta_u\Omega$

由此可见,凡是 β 相同的离子其基本频率是相同的,这就是稳定图中的等 β 线。β 值是由 a,q 值来决定的,可用下式计算:

$$\beta_u^2=a_u+\cfrac{q_u^2}{(\beta_u+2)^2-a_u-\cfrac{q_u^2}{(\beta_u+4)^2-a_u-\cfrac{q_u^2}{(\beta_u+6)^2-a_u-\cdots}}}+\cfrac{q_u^2}{(\beta_u-2)^2-a_u-\cfrac{q_u^2}{(\beta_u-4)^2-a_u-\cfrac{q_u^2}{(\beta_u-6)^2-a_u}}} \tag{5.39}$$

从(5.39)式可见,为计算 β 值,应采用数值逼近法,即逐一代入 β 值,然后比较 β_{n+1} 和 β_n 的差值,直至此差值小至忽略不计为止。在得到 β 值后,显然 ω 值也随之而定。但在离子阱质谱中为提高分辨率、灵敏度,实现质量扩展,提取单一离子所采取的一系列“共振”技术中,如共振排斥、轴向调制等在端盖电极上附加振荡电位的时间以及幅值是各不相同的。如轴向调制中,其频率约为环电极射频电位频率的一半,而幅值大于 $6V_{(p-p)}$;而在共振激发中(resonance excitation),其频率为保留在阱中的提取离子所相应的频率,而幅值不能过大,以能达到提高碰撞效率即可,避免提取离子排出离子阱,通常其幅值小于 $1.5V_{(o-p)}$。

4）离子回旋共振分析器(ion cyclotron resonance，ICR)

当一气相离子进入或产生于一个强磁场中时，离子将沿与磁场垂直的环形路径运动，称为回旋，其频率(ω_c)可用下式表示：

$$\omega_c = zB/2\pi m \tag{5.40}$$

式中，B 为离子强度；z 为离子电荷；m 为离子质量。

回旋频率 ω_c 只与 m/z 的倒数有关。增加运动速度时，离子回旋半径也相应增加。

回旋的离子可以从与其匹配的交变电场中吸收能量(发生共振)。当在回旋器外加上这种电场时，离子吸收能量后速度加快，随之回旋半径逐步增大；停止电场后，离子运动半径又变为常数。

当为一组 m/z 相同的离子时，合适的频率将使这些离子一起共振而发生能量变化，其他 m/z 离子则不受影响。由于共振离子的回旋可以产生称为相电流的信号，相电流可以在停止交变电场后观察到。离子回旋能在两极之间产生电容电流，电流大小与离子数有关，频率由共振离子的 m/z 决定。在已知磁场 B 存在时通过不同频率扫描，可以获得不同 m/z 的信息[9]。

感应产生的相电流由于共振离子在回旋时不断碰撞而失去能量并归于热平衡状态而逐步消失，这个过程的周期一般为 0.1～10 s，相电流的衰减信号与 Fourier 变换 NMR 中的自由感应衰减信号类似。

Fourier 变换质谱仪通常是应用在 ICR 质量分析器的仪器上(称为 FTMS)。首先用一个频率由低到高的线性增加频率(如 0.070～3.6MHz)的短脉冲(5ms)，在脉冲之后，再测定由离子室中多种 m/z 离子产生的相电流的衰减信号相关的图谱，并数字化储存，这样获得的时域衰减信号经 Fourier 变换后成为频域的图谱，即不同 m/z 的图谱。

在 FTMS 中，质量分辨率可用下式表示：

$$R = 1/2ft$$

式中，f 为回旋频率；t 为采集入号持续时间。

由此可知，质量分辨率与磁场强度(B)和时间(t)成正比，而与离子的 m/z 成反比。因为 t 与分析池的真空度有关，所以在 FTMS 仪器中，保持高真空度是必须的。同时，随着质量测量范围的增大，分辨率呈下降趋势。和其他质谱仪一样，质量测定的准确度受分辨率和信噪比的影响，在 FTMS 中，质量的准确度还受到阱电压和空间电荷相互作用的影响。为了提高质量测定的准确度，在实际工作中常采用内标法，将参比化合物与样品一起送入质谱仪，生成的离子即共同捕获在池内，以使参比物离子和样品离子处在同一环境中。这种方法的常规测定误差约 2 ppm。

脉冲离子回旋共振 Fourier 变换质谱法由于可以测量不同脉冲及不同延迟的信息,可以用于分子反应动力学研究。快速扫描的特性在 GC-MS 联用仪中也有非常好的优越性,与常规质量分析器的质谱仪相比,此种方法可以获得较高分辨率及较大相对分子质量的信号,但此类仪器非常昂贵。

5. 检测与记录

质谱仪常用的检测器有法拉第杯(Faraday cup)、电子倍增器及闪烁计数器、照相底片等。

法拉第杯是其中最简单的一种。法拉第杯应与质谱仪的其他部分保持一定电位差以便捕获离子,当离子经过一个或多个抑制栅极进入杯中时,将产生电流,经转换成电压后进行放大记录。法拉第杯的优点是简单可靠,配以合适的放大器可以检测离子流。但法拉第杯只适用于加速电压小于 1 kV 的质谱仪,因为更高的加速电压产生能量较大的离子流,这样的离子流轰击入口狭缝或抑制栅极时会产生大量二次电子甚至二次离子,从而影响信号检测。

电子倍增器的种类很多,其工作原理如图 5.10 所示。一定能量的离子轰击阴极导致电子发射,电子在电场的作用下,依次轰击下一次电极而被放大。电子倍增器的放大倍数一般为 10～108。电子倍增器中电子通过的时间很短,利用电子倍增器可以实现高灵敏、快速测定。但电子倍增器存在质量歧视效应,且随使用时间增加,增益会逐步减小。

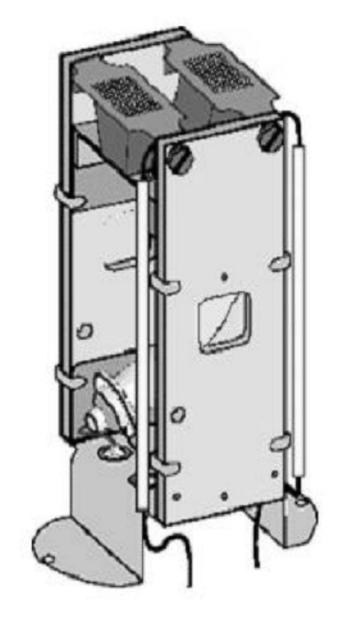
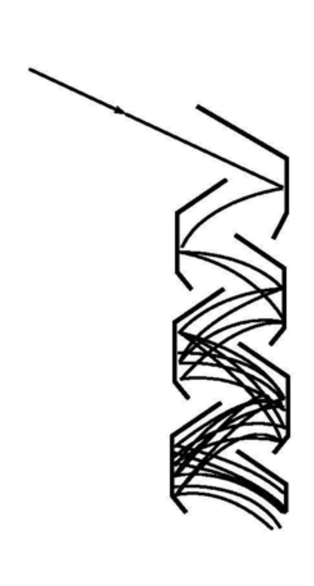



图 5.10 电子倍增管

近代质谱仪中常采用隧道电子倍增器，其工作原理与电子倍增器相似，因为体积较小，多个隧道电子倍增器可以串列起来，用于同时检测多个 m/z 不同的离子，从而大大提高分析效率。

质谱信号非常丰富，电子倍增器产生的信号可以通过一组具有不同灵敏度的检流计检出，再通过镜式记录仪（不是笔式记录仪）快速记录到光敏记录纸上。现代质谱仪一般都采用较高性能的计算机对产生的信号进行快速接收与处理，同时通过计算机可以对仪器条件等进行严格的监控，从而使精密度和灵敏度都有一定程度的提高。

5.1.3　质谱仪的主要性能指标

1. 质量范围

质量范围（mass range）是指质谱仪能够测量的离子质量范围，通常用最小和最大离子的离子质量表示。离子质量通常采用相对原子质量（relative atomic mass）进行度量。相对原子质量定义为元素的平均原子质量与核素 ^{12}C 原子质量的 1/12 的比值。在生物大分子的质谱分析中，还常用道尔顿（dalton，Da）作为度量单位。Da 与 U 两者相差万分之三左右，对于低分辨率质谱，可以视为 1Da = 1U。

目前，生物质谱中使用的四极质谱仪的质量范围一般为 10～2000U，而 MALDI-TOF 的质量范围可以扩展到几十万道尔顿。

2. 分辨率

分辨率（resolution，R）是指仪器能分离相邻两质谱峰的能力。若将强度近似相等、质量分别为 m_1 和 m_2 的两个相邻峰恰好分开，则质谱仪的分辨率定义为

$$R = m_1/(m_2 - m_1) = m_1/\Delta M \tag{5.41}$$

其中，$m_1 < m_2$，故在两峰质量相差越小时，要求仪器分辨率越大。对“恰好分开”的表述，目前有几种定义：①10%谷定义，即两峰重叠后形成的谷高为峰高的10%；②半峰宽（full-width，half-maximum，FWHM）定义，即 ΔM 为离子 M 相对丰度 50% 处的峰宽；③50%谷定义，即两峰重叠后形成的谷高为峰高的 50%，如图 5.11 所示。

在实际工作中，有时很难找到相邻的且峰高相等的两个峰，同时峰谷又为峰高的 10%。在这种情况下，可任选一单峰，测其峰高 5%处的峰宽 $W_{0.05}$，即可当作式(5.41)中的 ΔM，此时分辨率定义为 $R = m/W_{0.85}$

如果该峰是高斯型的，上述两式计算结果就是一样的。

质谱仪的分辨本领由 3 个因素决定：离子通道的半径；加速器与收集器狭缝宽度；离子源的性质。

质谱仪的分辨本领几乎决定了仪器的价格。分辨率在 500 左右的质谱仪可以

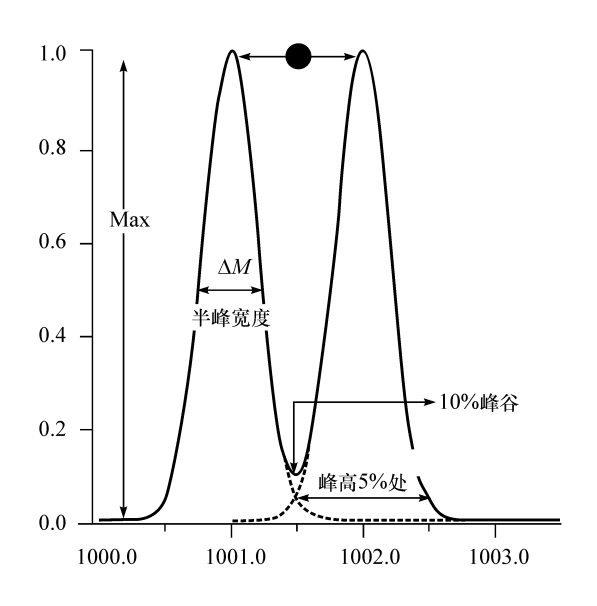


图 5.11　质谱分辨率

满足一般有机分析的要求，此类仪器的质量分析器一般是四极滤质器、离子阱等，仪器价格相对较低。若要进行准确的同位素质量及有机分子和生物大分子质量的准确测定，则需要使用分辨率大于 10 000 的高分辨率质谱仪，其价格也将会是低分辨率仪器的 4 倍以上。

3. 灵敏度

灵敏度(sensitivity)是仪器记录所产生的峰信号强度与所用样品量之间关系的度量。质谱仪的灵敏度有绝对灵敏度、相对灵敏度和分析灵敏度等几种表示方法。绝对灵敏度是指仪器可以检测到的最小样品量；相对灵敏度是指仪器可以同时检测的大组分与小组分含量之比；分析灵敏度则指输入仪器的样品量与仪器输出的信号之比。通常，将绝对灵敏度与分析灵敏度结合，用检测限表示质谱仪的灵敏度，即在一定分辨率时，产生一定信噪比的分子离子峰所需要的样品量。在 MS 中，信噪比常规为 10∶1。一般台式 Q-MS 的检测限，在扫描方式为纳克到亚皮克级，在 SIM 方式为皮克到飞克级。在表示仪器灵敏度数据时，必须注明以下测试条件：检测样品、检测峰(常用分子离子峰)、分辨率、扫描速度及信噪比(S/N)。

4. 质量准确度(mass accuracy)

质量准确度又称质量精度，即离子质量实测值 M 与理论值 M_0 的相对误差：

$$质量精度 = |M - M_0| / m \times 10^6 (\text{ppm}) \quad (m\ 为离子质量数的整数)$$

仪器的质量精度一般应小于 10 ppm。

5. 扫描速度

扫描速度指质量分析器在 10 倍质量范围内(如 60～600)扫描所需的时间,用 s 十倍$^{-1}$或 amus^{-1}表示。通常扫描速度为 0.1～1.5 s 十倍$^{-1}$。目前, Q-MS 的扫描速度可快至 2000～5000amus^{-1}。

6. 线性范围

MS 的线性范围一般为 10^2～10^4。

5.2　质谱联用技术

将两种或多种方法结合起来使用的技术称为联用技术(hyphenated method),质谱联用技术是指质谱技术与其他分离、分析技术的在线联合使用。质谱联用技术的主要问题是解决与质谱相连的接口(interface)及相关信息的高速获取与储存等问题。接口是色谱联用技术中的关键装置,它将两种分析仪器的分析方法结合起来,协同作用,取长补短,获得了两种仪器单独使用时所不具备的功能。

5.2.1　色谱-质谱联用技术

色谱-质谱联用技术在目前使用最为广泛,它把色谱技术强有力的分离能力与质谱技术有效的定性分析能力相结合,特别适合于复杂体系的分离分析。

色谱-质谱联用技术包括气相色谱-质谱(GC-MS)、液相色谱-质谱(LC-MS)、毛细管电泳-质谱(CE-MS)联用等。其中,GC-MS 是开发最早的,LC-MS 的开发在技术上比 GC-MS 要困难得多,主要是因为 HPLC 的流动相是液体,若直接进入质谱,将严重破坏质谱系统的真空,干扰被测样品的质谱分析。直到电喷雾电离(ESI)接口和大气压化学电离(APCI)接口出现,在 20 世纪 90 年代才有了成熟的商品液相色谱-质谱联用仪。

1. 气相色谱-质谱联用

GC-MS 是目前最常用的一种联用技术,在销售的商品质谱仪中占有相当大的一部分比例。从毛细管气相色谱柱中流出的成分可直接引入质谱仪的离子化室,但填充柱必须经过一个分子分离器降低气压并将载气与样品分子分开(图 5.12)。

在分子分离器中从气相色谱来的载气及样品离子经一小孔加速喷射入喷射腔中,具有较大质量的样品分子将在惯性作用下继续直线运动而进入捕捉器中,载气(通常为氦气)由于质量较小、扩散速率较快,容易被真空泵抽走。必要时使用多次喷射,经分子分离器后,50%以上的样品被浓缩并进入离子源,而压强则由 1.0×

10^{-5} Pa 变为 1.3×10^{-2} Pa。

组分经离子源电离后，位于离子源出口狭缝安装的总离子流检测器检测到离子流信号，经放大记录后成为色谱图。当某组分出现时，总离子流检测器发出触发信号，启动质谱仪开始扫描并获得该组分的质谱图。

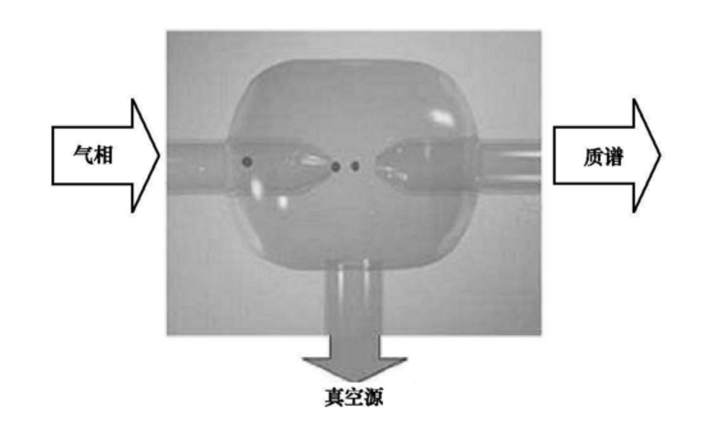


图 5.12　GC-MS 接口图

用于与 GC 联用的质谱仪有磁式、双聚焦、四极滤质器式、离子阱式等质谱仪，其中，四极滤质器及离子阱式质谱仪由于具有较快的扫描速度(约 10 次 · s^{-1})，应用较多。其中，离子阱由于结构简单、价格较低，近些年发展更快。

GC-MS 的应用十分广泛，可从环境污染分析、食品香味分析鉴定到医疗诊断、药物代谢研究和毒物分析等。而且 GC-MS 是国际奥林匹克委员会进行药检的有力工具之一。

2. 液相色谱-质谱联用

LC-MS 联用技术是目前使用最为广泛的一类联用技术。LC 分离要使用大量的流动相，如何有效地除去流动相而不损失样品，是 LC-MS 联用技术的难题之一。早期采用“传动带技术”，即将流动液滴到一条转动的样品带上，经加热除去溶剂，进入真空系统后再离解检测。现在广泛使用的是“离子喷雾”(ion spray)和“电喷雾”(electrospray)技术，有效地实现了 LC 与 MS 的联接[10]。

离子喷雾及电喷雾技术是使离子从荷电微滴直接发射入气相，这一离子蒸发过程如图 5.4 所示。它们使极性和热不稳定的化合物不发生任何降解而引入质谱仪中，从而实现任何液相分离技术，如 HPLC 及 CE 等与质谱仪的联用。几种典型的 LC-MS 接口见图 5.13。

在热喷雾接口中，来自 HPLC 的流出液通过不锈钢柱直接进入喷雾器中，靠高速空气或氮气的喷射变成细雾，细雾被同轴气体吹入一加热器内气化，进入大气

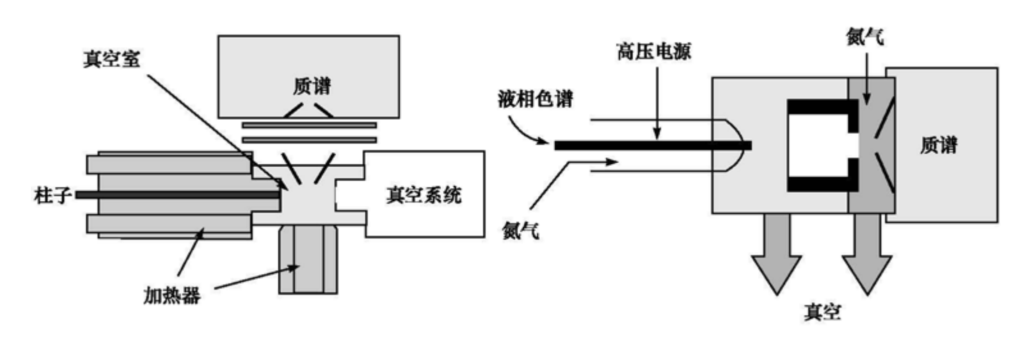


图5.13　LC-MS接口图

压下化学电离源反应区电离,样品离子再进入质谱仪分析。热喷雾LC-MS接口的方法可用于热稳定性较好的化合物分析。

在离子喷雾的接口中,被分析样品液体进入一个带有高电压的喷雾器,形成带有高电荷微滴的雾,当微滴蒸发时,经过一个非常低的能量转移过程形成含有一个或多个电荷的离子(与液相存在的形式相同),进入质谱可以进行匹克级分子完全分析,这对只有极少量样品可供使用的诸如生化分析的应用极为重要[11]。

3. 色谱-质谱联用技术提供的信息

色谱-质谱联用技术能提供比单独使用一种技术更为丰富的信息,通常可以得到三种类型的谱图。

1) 总离子流色谱图

将MS中各组分产生的总离子流对保留时间或扫描次数作图,即得总离子流色谱图(total ion current chromatogram,TIC)。TIC是以质谱仪为检测器所得到的色谱图,响应信号是每个组分的总离子流强度(即该组分所有 m/z 的离子强度的加和),也同样给出保留值、峰高和峰面积。TIC没有质谱信息,用来表明或监视基线、峰面积和分离度等色谱性能特征。

2) 质量色谱图

质量色谱图(mass chromatogram,MC)是在一次扫描中,只记录某相对原子质量(m/z)的离子流强度随时间变化所得的谱图。为了充分利用全扫描质谱的信息,可选取其中几个特征离子的峰强,对保留时间作图,即得到MC。MC不同于TIC,它具有质谱和色谱两者的信息,改变不同的提取离子,可得到不同的MC。因它仅提取了部分离子作图,故又称为提取离子色谱图(extraction ion chromatogram,EIC)。

3) 选择离子监测图

选择离子监测图(selective ion monitoring,SIM)是预先选定1种或2～3种特征离子进行跳变扫描,得出这些离子峰强度随时间变化的图形。SIM也具有质谱和色谱两者的信息,与MC一样,都是特征离子的色谱图,但二者又有区别。MC是先扫描,后选择特征离子,通过降低本底来提高检出性能;SIM是先选定特征离子,后扫描,通过增加特征离子的峰强来提高检出性能。

5.2.2 质谱-质谱联用技术——串联质谱法

串联质谱法(tandem mass spectrometry, MS-MS)是质谱法的重要联用技术之一,其方法是将两台质谱仪串联起来代替GC-MS或LC-MS。第一台质谱仪起类似于GC或LC的作用,用于分离复杂样品中各组分的分子离子,这些离子依次被导入第二台质谱仪中,从而产生这些分子离子的碎片质谱[12]。一般质谱仪Ⅰ采用软电离技术产生分子离子或质子化分子离子$[M+H]^+$。为了获得这些分子离子的质谱,将它们分别导入一碰撞室(field free collision chamber)中,使其与氦分子在$1.33\times(10^{-1}\sim10^{-2})$ Pa($10^{-3}\sim10^{-14}$ Torr)压强下碰撞活化而产生类似电子轰击源产生的碎片,再用质谱仪Ⅱ进行扫描。这种应用称为子离子串联质谱分析(daughter ion tandem mass spectrometry)。

另一种MS-MS方法为母离子串联质谱分析法(parrent ion tandem mass spectrometry)。此方法中,质谱仪Ⅱ用于子离子监测,而质谱仪Ⅰ进行扫描。这种方法可用于分析鉴定产生相同子离子质谱的一类化合物。

各式质量分析器都可用于串联质谱中,常用的串联方式之一是ESI-Q-TOF(图5.14)。将三组四极滤质器串联起来,样品经软电离源电离后加速进入第一极,按一般四极滤质方式分离出母离子,这些离子快速进入第二极,此极为碰撞室,母离子开始发生进一步裂解,此极工作在仅有射频场(无直流电压)模式,对离子进行聚焦,再引入$(1.3\sim13)\times10^{-2}$ Pa的氦气,使它们发生碰撞而裂解,子离子引入第三级质谱(TOF)进行扫描记录。

用MS-MS方法可以得到以下信息:

(1) 扫描Q_3得到子离子谱以检定选定的母离子;

(2) Q_3选定特定m/z的子离子,扫描Q_1以搜索可产生此特定m/z离子的所有前体离子;

(3) 中性丢失,寻找可产生共同的中性碎片的前体离子;

(4) 选择性反应监测(selecting reaction monitoring,SRM),以对目标化合物进行定性、定量,并达到更高的选择性和灵敏度。用SRM对目标化合物定量测定,有可能毋需先进行色谱分色,从而节省分析时间。

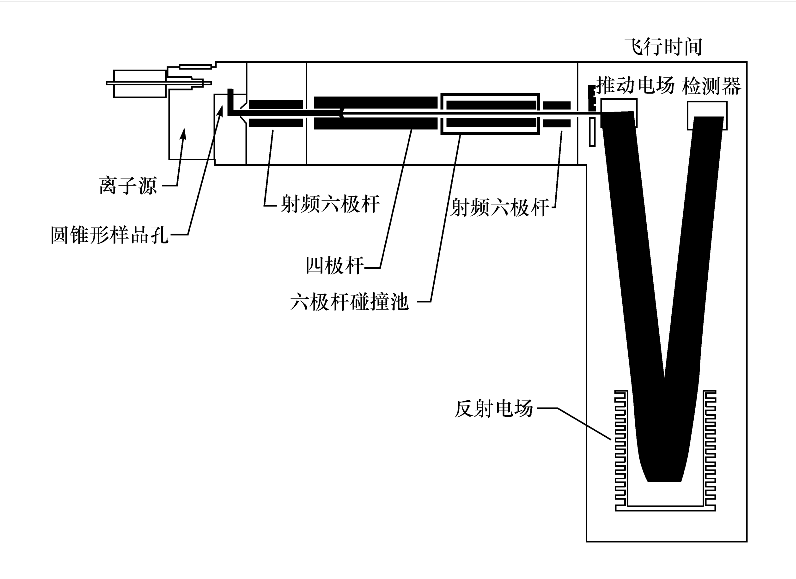


图 5.14　ESI-Q-TOF 仪器结构示意图

与串联质谱平行的一个概念是碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)。在没有出现串联质谱时,为获得分子结构信息,需要在离子源内(ion source)对离子进行碰撞,使其碎裂。源内 CID 灵敏度高,但由于没有选择性,因此碎片的专一性不强。串联质谱出现后,逐渐取代了源内 CID。严格地说,CID 仅指离子解离成碎片的过程,串联质谱则包括了母离子选择、CID 和子离子分析 3 个过程。

串联质谱法将四极质谱或离子阱质谱对母离子的高选择性与飞行时间质谱高质量精确度、高分辨、高灵敏度相结合,使其精确度小于 5 ppm,分辨率大于 10 000,可以获得更为丰富的质量与结构信息。

5.3　生物质谱的应用

5.3.1　生物质谱在蛋白质和多肽研究中的应用

蛋白质是生物体中含量最高、功能最重要的生物大分子,存在于所有生物细胞,约占细胞干质量的 50%以上。作为生命的物质基础之一,蛋白质在催化生命体内各种反应进行、调节代谢、抵御外来物质入侵及控制遗传信息等方面都起着至关重要的作用,因此,蛋白质也是生命科学中极为重要的研究对象。关于蛋白质的分析研究,一直是化学家及生物学家极为关注的问题,其研究的内容主要包括相对分子质量测定、氨基酸鉴定、蛋白质序列分析及立体化学分析等。随着生命科学的发展,仪器分析手段的更新,尤其是质谱分析技术的不断成熟,使这一领域的研究发展迅速。

1. 相对分子质量测定

相对分子质量是蛋白质、多肽、核酸、寡糖与多糖的最基本的物理参数之一，是蛋白质、多肽识别与鉴定中首先需要测定的参数，也是基因工程产品申报新药的重要数据之一。相对分子质量正确与否往往代表着所测定的蛋白质结构正确与否，或者意味着一种新蛋白质的发现。生物质谱可测定分子质量高达 400kDa 的生物大分子，准确度高达 0.001%～0.1%，远远高于目前常规应用的 SDS 电泳与高效凝胶色谱技术。

2. 肽谱测定

肽谱(peptide mapping)是指蛋白质经过化学裂解或酶解后所获得的多肽混合物的图谱，肽谱分析与蛋白质的氨基酸分析、序列分析所获得的综合信息是鉴定蛋白质一级结构的重要技术手段。肽谱的一致性是基因工程产品工艺稳定性的验证指标，根据肽段质量数变化，可对基因产品的插入、缺失、突变进行对比分析。获得肽谱的方法有 SDS-PAGE、HPLC、CE、MS 等。通过 MS 获得的肽谱又称为肽质量指纹谱(peptide mass fingerprint，PMF)，它是将蛋白质经酶解后得到的肽混合物进行质谱分析，给出全部肽段的准确质量，结合蛋白质数据库检索，可实现对蛋白质的快速鉴别和高通量筛选，已成为目前蛋白质组学研究中必不可少的重要技术手段。图 5.15 的例子是通过二维凝胶电泳分离得到的人肺巨细胞癌细胞某一蛋白点的肽质量指纹谱，经数据库检索鉴定该蛋白质是磷酸丙糖异构酶[13]。有关 PMF 更为详细的内容见第 11 章。

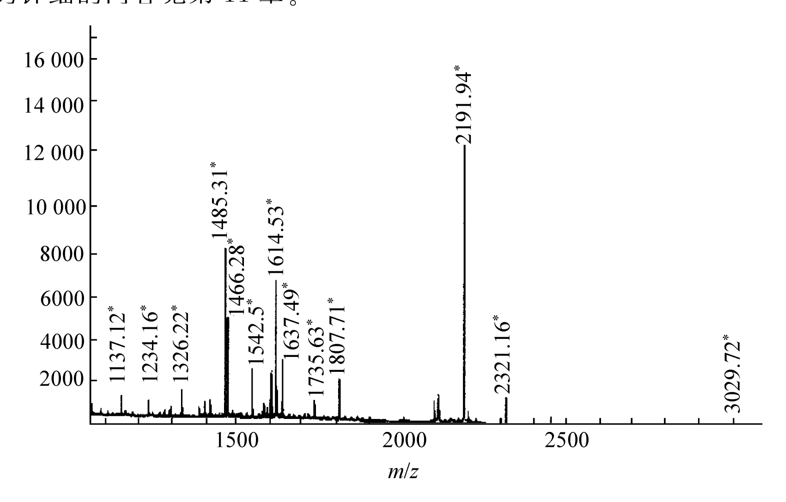


图 5.15 胶上酶解蛋白质 MALDI-TOF 肽谱

标有“＊”的峰表示在数据库检索中匹配的峰

3. 肽序列测定技术

现有的肽和蛋白质的测序方法包括 N 端序列测定的化学方法 Edman 法、C 端酶解方法、C 端化学降解法等，这些方法都存在一些缺陷。例如，作为肽和蛋白质序列测定标准方法的 N 端氨基酸苯异硫氰酸酯(phenylisothiocyanate)PITC 分析法(即 Edman 法，又称 PTH 法)，测序速度较慢(50 个氨基酸残基/天)，样品用量较大(纳摩尔级或几十皮摩尔级)，对样品纯度要求很高，对于修饰氨基酸残基往往会错误识别，而对 N 端保护的肽链则无法测序[14]。C 端化学降解测序法则由于无法找到像 PITC 这样理想的化学探针，其发展仍面临着很大的困难。在这种背景下，质谱由于具有很高的灵敏度、准确性、易操作性、快速性及很好的普适性而备受科学家的广泛注意。在质谱测序中，灵敏度及准确性随分子质量增大有明显降低，所以肽的序列分析比蛋白质容易许多，许多研究也都是以肽作为分析对象进行的。

串联质谱技术可直接测定肽段的氨基酸序列。从一级质谱产生的肽段中选择母离子，进入二级质谱，经惰性气体碰撞后肽段发生裂解，由所得到的各离子碎片的质量数差值推定肽段序列，再通过数据库搜索鉴定蛋白质。较之传统的 Edman 降解末端测序技术，生物质谱具有不受末端封闭的限制、灵敏度高、速度快的特点。另外一种间接的肽序列测定技术，即肽阶梯序列技术(peptide ladder sequence)，是通过末端酶解或化学降解，产生一组相互之间差一个氨基酸残基的多肽系列，经 MALDI-TOF-MS 鉴定后，由所得到的肽阶梯图中各肽段的分子质量差值确定末端的氨基酸序列，从而用于数据库查寻。目前蛋白质组研究中广泛应用的大规模蛋白质鉴定方法是采用样本经 LC-MS/MS 分析后产生的串联质谱数据文件直接检索蛋白质序列数据库鉴定蛋白质，不需要读出肽段的序列，尤其适用于用“鸟枪法”(shotgun)酶切方式得到的混合蛋白质酶切产物或 SDS-PAGE 胶分离的混合蛋白质条带酶切产物的鉴定。更为详细的内容见第 11 章。

4. 巯基和二硫键定位

二硫键在维持蛋白质及多肽三级结构及正确折叠中具有重要作用，同时也是研究翻译后修饰所经常要面临的问题，自由巯基在研究亚基之间及蛋白质与其他物质相互作用中具有重要意义。利用碘乙酰胺、4-乙烯吡啶、2-巯基苏糖醇等试剂对蛋白质进行烷基化和还原烷基化，结合蛋白酶切、肽谱技术，利用生物质谱的准确分子质量测定，可实现对二硫键和自由巯基的快速定位与确定[15]。这在含有多二硫键结构的活性多肽与蛋白质研究中有重要用途。

5. 蛋白质翻译后修饰

大多数真核生物所表达的蛋白质，需经过一系列的翻译后加工和修饰，才能形

成最终复杂的功能执行体。蛋白质翻译后修饰(protein translation modification, PTM)(如磷酸化和糖基化)决定着蛋白质的定位、活性和功能,同时又在控制细胞功能执行过程中扮演着主要角色。由于特定类型的修饰会产生与理论质量数相差特定数值的肽段,如磷酸化会产生一个比理论质量数增加 80Da($1Da=1.66\times10^{-27}kg$)的肽段。通过解析质谱测得肽段的质量数或碎片离子谱图,便可识别蛋白质翻译后修饰信息。常用研究翻译后修饰的手段是二维电泳-免疫印渍-质谱技术。研究蛋白质磷酸化,或采用亲和技术提取修饰肽段,并用串联质谱鉴定修饰肽段,这种方式常用于研究蛋白质磷酸化或糖基化。

利用固相化金属离子亲和提取技术(immobilized metal affinity chromatography, IMAC)和生物质谱结合分析蛋白质磷酸化的方法早有报道[16],而对复杂蛋白质混合物的通量磷酸化分析方法直至最近才有研究。Kim 等[17]研究了热休克及热耐受相关的磷酸化蛋白质。其策略是,首先用二维凝胶电泳分离热休克处理后的 RIF-1 及其热耐受派生细胞系 TR-RIF-1 的全蛋白质,再转膜利用抗酪氨酸磷酸化的抗体进行免疫印迹检测,检测到的磷酸化蛋白质点从胶上切下后用 MALDI-TOF-MS 鉴定。通过这种方式,发现 93 个蛋白质点的磷酸化水平存在变化,其中 81 个蛋白质点成功获得鉴定,利用三种磷酸化位点预测软件 Netphos、ScanProsite、Scansite 成功预测出了可能的磷酸化位点。另外一种基于亲和技术的研究策略,首先利用固相化了抗磷酸化酪氨酸抗体的琼脂糖亲和富集酪氨酸磷酸化蛋白质,然后结合全蛋白质酶切、肽段甲酯化、IMAC 提取和多维液相色谱——离子肼串联质谱鉴定技术,开展对人源细胞的苏氨酸磷酸化信号通路作图,成功鉴定出 32 个蛋白质的 64 个苏氨酸磷酸化位点。类似的策略先前曾用于芽殖酵母磷酸化蛋白质的分析,共检测出 1000 多个磷酸化肽段。这种方法不仅适用于磷酸化蛋白质作图,同样适用于差异磷酸化蛋白质组的规模化分析。

蛋白质糖基化修饰的通量化研究最近也有报道,主要是利用蛋白质组和生物质谱技术,通过同位素标记研究 *N*-糖基化蛋白质。其基本思想都是采用亲和技术提取 *N*-糖肽,再利用脱糖酶 PNGaseF 脱去糖链,最后用串联质谱测定糖肽序列并确定糖基化位点。Abersold 等[18]研究了质膜及人血清中所含的糖蛋白,其方案是首先将糖五元环氧化开链生成二醛,通过自由醛基将糖蛋白偶联至固化了酰肼的树脂上,用胰蛋白酶降解共价结合在树脂上的糖蛋白后,洗脱,将只剩下糖肽保留在树脂上,在脱糖酶 PNGaseF 的作用下,树脂上的糖肽脱去糖链被释放出,用串联质谱测定其序列,通过这种方式,该研究共检测出 104 个糖肽,其中每一个都含有保守 *N*-连糖结构域(*N*-X-S/T)。由于利用了共价亲和技术,该方法检测糖肽具有很高的特异性。另外一个研究成功鉴定出 250 个线虫 *N*-糖蛋白,同时识别出 400 个 *N*-糖基化位点,该研究的技术体系主要基于凝集素亲和捕获柱,首先亲和提取富集纯化 *N*-糖蛋白,再用胰蛋白酶降解这些糖蛋白,并将酶切获得的肽段混合物

再一次通过凝集素亲和柱，最后得到 *N*-糖肽，用外切酶脱糖后测定糖肽序列。上面的两种 *N*-连糖测定方法都采用了同位素标记技术，提高了定量能力及对糖肽的正确识别。

此外，Gygi[19]等利用蛋白质组学手段对蛋白质泛素化也进行了研究。利用带 6 × His 标签的泛素亲和提取出与泛素结合的蛋白质，蛋白质全酶切后用多维色谱串联质谱鉴定，通过这种方法，共获得 1075 个蛋白质，并从 72 个泛素结合蛋白中精确检测到 110 个泛素化位点。

6. 定量蛋白质组分析

蛋白质组研究的一个重要领域是对不同生理和病理条件下蛋白质表达的差异进行比较分析。为了在质谱分析的过程中实现对蛋白质差异的准确定量分析，一种被称为同位素编码亲和标签的技术（isotope-coded affinity tag，ICAT）得到了成功应用。其原理是首先利用一对分别含重元素和轻元素的试剂特异性标记成对蛋白质样品中的半胱氨酸，两种标记试剂的分子质量相差 8Da。当两种蛋白质样品混合并酶切后，利用亲和色谱提取标记肽段，由于两种同位素标记状态的肽段在化学结构上完全相同，在色谱分离时的保留行为也类似，使得成对肽段在质谱上以 8Da 的形式共同出现。比较两个肽段强度，可以实现差异蛋白质组分析。除了体外标记的定量蛋白质组技术，采用细胞培养时原位 ^{15}N 标记技术，通过二维电泳技术和 MALDI-TOF/MS 也可以实现差异定量蛋白质组分析。更为详细的内容见第 11 章。

7. 蛋白质相互作用研究

大部分蛋白质的功能执行是通过蛋白质-蛋白质相互作用来实现的，因此也使蛋白质相互作用成为蛋白质组学研究的一个重要组成部分。用质谱技术研究此类问题主要有两种策略：第一种是分离获得结合蛋白，再用 SDS-PAGE 分离，并进行胶内酶切与串联质谱分析；或将混合蛋白质直接酶解，用多维色谱串联质谱进行鉴定。

基于质谱的相互作用研究分 3 个步骤：诱饵设置、复合物亲和纯化以及相互作用的分析。常用的诱饵设置方法有两种，一种是利用抗体免疫亲和沉淀技术，利用抗体去钓取抗原，在该过程中与抗原相互作用的蛋白质将被同时获得；另一种方法是将目标蛋白质标记上一个可以进行选择性提取的标签，在该蛋白质表达后，通过提取标记片段的方法间接提取目标蛋白质，同时获得与其相互作用的蛋白质。由于后一种方法无需制备大量的抗体，可以进行高通量的相互作用筛选，是目前通量化蛋白质-蛋白质相互研究中常用的手段。尤其是最近的一种支持两步纯化的亲和标签（串联亲和纯化或 TAP）技术，首先由 Rigaut 等[20]在酵母体系中开发，后经

Forler 等[21]引入 RNA 干扰技术以使该方法能用于更高级的真核生物细胞中蛋白质相互作用的研究。该体系是由钙调蛋白结合域和蛋白 A 的免疫球蛋白结合域通过一个可被烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus,TMV)蛋白酶剪切的序列连接而成,标记的蛋白质首先与被免疫球蛋白修饰的固相载体结合,经 TEV 蛋白酶水解回收再次结合至钙调蛋白柱子上,然后利用递增的钙离子浓度进行选择性洗脱,最后利用串联质谱技术鉴定洗脱下来的肽段,便可获得相互作用信息。

蛋白质与其他生物分子相互作用在信号传导、免疫反应等生命过程中起重要作用。软电离技术的发展,促进了生物质谱在蛋白质复合物研究中的应用,目前已涉及了分子伴侣对蛋白质折叠作用、蛋白质/DNA 复合物、RNA/多肽复合物、蛋白质-过渡金属复合物及蛋白质- SDS 加合物等多种类型的复合物的结构和结合位点的研究。

5.3.2 生物质谱在多糖结构测定中的应用

多糖的免疫功能是近年来研究的热点领域,其结构的测定是功能研究的基础。多糖不像蛋白质和核酸,少数的分子即可由于连接位点的不同而形成复杂多变的结构,因而难以用传统的化学方法研究。生物质谱具备了测定多糖结构的功能,配以适当的化学标记或酶降解,可对多糖结构进行研究。采用 MALDI-TOF-MS 已对糖蛋白中的寡糖侧链进行了分析,包括糖基化位点、糖苷键类型、糖基连接方式以及寡糖序列测定等。与传统的化学方法相比,质谱技术具有操作简便、省时、结果直观等特点。下面简单叙述质谱法在糖蛋白分子质量测定和寡糖的分析上的应用。

1. 糖蛋白分子质量测定[22]

对于糖蛋白药物的质量控制来说,分子质量是十分关键的,通过分子质量的测定,可以确定含糖量。由于糖的影响,SDS-PAGE 法的测定误差较大,质谱法是最准确的测定方法。由于糖蛋白的微不均匀性且其含有唾液酸,在进行 MALDI/MS 分析时,必须优化各种实验条件。

2. 寡糖的分析[23]

2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid,DHB)是一种较好的基质,适合分析中性寡糖。6-氮杂-2 硫代胸腺嘧啶(6-aza-2-thiothymine,ATT)用于分析酸性寡糖灵敏度好,但是会产生脱羧峰,也会少量地脱唾液酸,限制了它的使用。2,4,6-三羟基乙酮(2,4,6-thrhydroxyacetophenone,THAP)和有机酸铵盐混合使用是分析酸性寡糖的又一好的基质,不脱唾液酸。铵盐浓度为 5～20 $mmol \cdot L^{-1}$ 较好,铵盐浓度低,会产生 Na^+ 加合离子,并且不同结晶位置的质谱信号变化较大;浓度过高,则会影响结晶,导致信噪比下降。结晶条件十分关键,空气干燥结晶法可产生大的结晶,有一个好的位点。用真空结晶法,产生均匀且小的结晶,不必

去找一个好的位点。但是,真空干燥结晶的样品,表面有一层油,影响灵敏度,所以必须在空气中放置,让其吸收一部分水。图 5.16 和图 5.17 是用 DHB 和 THAP 分析寡糖的比较。

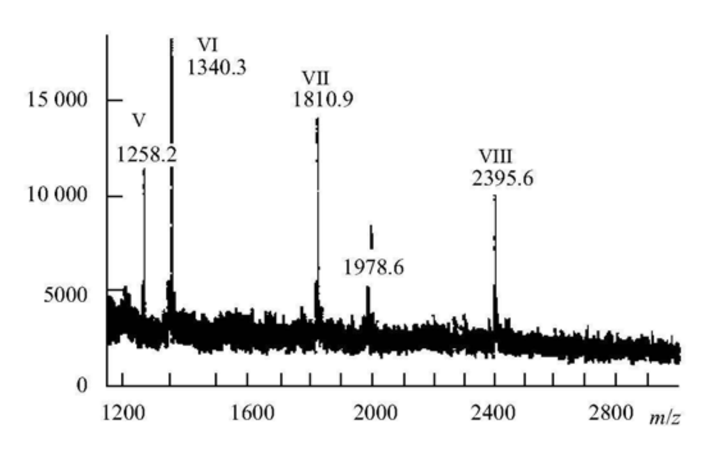


图 5.16　4 种中性糖和 4 种酸性糖的 MALDI-TOF-MS 图
基质 DHB

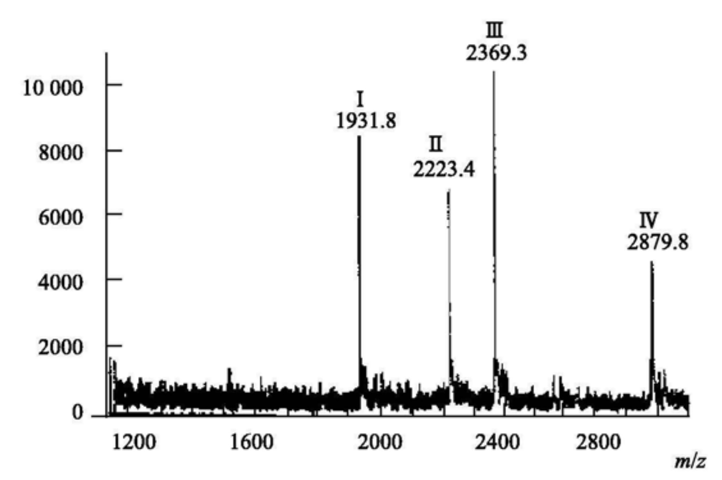


图 5.17　4 种中性糖和 4 种酸性糖的 MALDI-TOF-MS 图
基质 THAP

3. 寡糖的序列分析

将糖蛋白用一系列的酶解,结合 MALDI-MS 可以分析出寡糖的连接顺序。Novotny[24]报道阿拉伯糖脎结晶好,离子化效率高,是一种分析寡糖的好的基质。用该基质结合糖外切酶在 MALDI 的样品靶上完成了寡糖的序列分析。

5.3.3　生物质谱在寡核苷酸和核酸分析中的应用

核酸(nucleic acid)是与蛋白质相似的一种生物大分子,核酸的构成单位不是

氨基酸,而是核苷酸(nucleotide)。核酸分为脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)两大类。DNA 是遗传信息的载体,RNA 则是蛋白质生物合成中起重要作用的物质,其结构分析是生命科学中一个非常重要的课题,近年来发现质谱是进行核酸的分子质量测定、核酸一级结构分析和 SNP 分析的有利手段之一 。

1. 核酸的分子质量测定

MALDI 质谱曾用来测定核酸的分子质量,但比测蛋白质困难。测定核酸时,其信噪比和分辨率一般比测定蛋白质低,因核酸分子带有磷酸基,极性和电负性大,容易吸收大量碱金属离子,如 K^+ 、Na^+ 等,使核酸形成多种分子质量的碱性离子加合物,它们的存在导致离子速度空间和能量分散,引起核酸分子离子峰变宽,不易准确测定其质量数。此外,核酸分子所带的碱基有很强的紫外吸收,使分子接受过量辐射能,易于碎裂,蛋白质则需借助强紫外吸收基质,帮助其解吸,因此采用解吸蛋白质类基质和激光,效果不好。MALDI 质谱测核酸分子质量的另一困扰是分子离子峰强度不够,特别是长链多核苷酸,以至测不准分子质量。分子离子较弱是由于分子离子不稳定,发生了裂解。核酸分子含碱基不同,其稳定性不同,因而 MALDI 质谱中分子离子强度也不一样。一般说来,含胸腺嘧啶(T)的核苷酸离子稳定性较高,丰度较强,含其他碱基(A,C,G)则较弱。因分子离子发生裂解.研究证明核酸裂解过程中,首先发生碱基质子化,随后 *N*-苷键断裂失去碱基,同时磷酸二酯基的 3′-C—O 键断裂。MALDI 质谱中分子离子峰弱的另一原因是样品在探头上解吸效率和电离效率不高。为了提高 DNA 解吸效率,一般选择合适的基质。目前基质的选择尚无固定的原则可循,需视样品对象来选择合适基质。

迄今用 MALDI 质谱分析出最大分子质量的 DNA 是含 500 个碱基对的双链核酸 DNA,用 PCR 扩增的噬菌体基因组,分子质量为 1.5×10^5 Da,质谱见图 5.18,基质是 3-羟基吡啶-2-羧酸和吡啶-2-羧酸混合物,激光波长为 266nm,加速电压为 45keV。由于采用较大的加速电压,分子离子在加速区停留时间短,避免了分子离子的裂解。样品是双链 DNA,但在质谱中却是单链体,可能是由于在样品制备过程中发生变性,或在质谱离子源内探头上解吸过程中转变为单链体[25]。

ESI 质谱分析寡核苷酸也不及蛋白质,同样是两个原因,其一是碱金属离子加合物的干扰,其二是分子离子易裂解,以致强度很弱。采用加入铵盐置换的办法可消除 K^+ 或 Na^+ 加合离子,若不用铵置换处理,则可观察到在 ESI 质谱中,几乎所有磷酸二酯基都结合有一个 Na^+ 。用铵盐处理后,高达 48 个碱基的寡核苷酸中,不含 Na^+ 加合离子,配有 ESI 电离源的傅里叶变换质谱仪(ESI-FTMS)可用于 DNA 分析。图 5.19 所示分析含 50 个碱基的寡核苷酸,测量精度达 $10\mu g\cdot L^{-1}$[26]。

[500 mer]⁻
[500 mer]²⁻
离子信号/V
0.007
0.006
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
50 000　90 000　130 000　170 000　210 000　250 000
m/z

图 5.18　含 500 个碱基单链的 DNA MALDI-MS 图

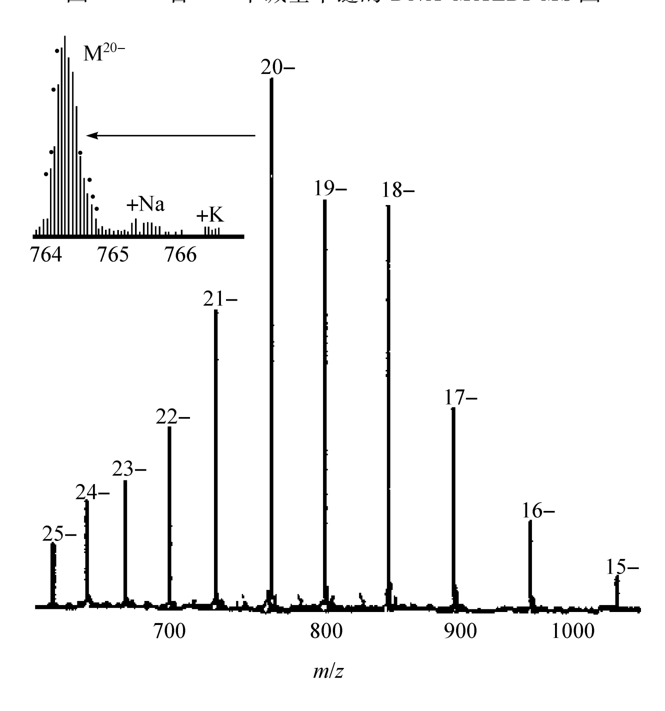


图 5.19　50 个碱基单链 DNA 的 ESI-FTMS

ESI 产生的多电荷离子,可以扩展质谱的可测质量限度,有利于测定生物大分子的分子质量,但多电荷离子不利于离子的结构测定,加入有机酸或有机碱可调控样品溶液 pH 以抑制多电荷离子的形成。发现用混合溶剂(如咪唑、六氢吡啶和乙酸溶于乙腈-水(80:20)中)作为样品溶剂既可抑制钾、钠加合离子的形成,又可减少多电荷程度。

2. 核酸测序质谱法

用质谱法进行 DNA 测序可采用下列 3 种途径:Sanger 反应质谱测序法、酶解质谱测序法和质谱裂解测序法。这 3 种途径都可用 MALDI 质谱或 ESI 质谱来实现,现分别叙述于下。

1) Sanger 反应质谱测序法

一般常规 Sanger 测序法是将反应产物用凝胶电泳分离后,放射性自显影鉴定,这是目前较普遍采用的 DNA 测序法。Sanger 反应质谱测序法是将自显影鉴定改用质谱分析,大大加快了分析速度。曾用人工配制寡核苷酸混合物,模拟 Sanger 反应产物,用质谱法进行分析,考核此法的可行性[27]。溶液中不含反应试剂(杂质可先自反应产物中除去),配制的混合物含 17～40 个碱基的 4 个不同长度寡核苷酸,测得的 MALDI 质谱图如图 5.20 所示,实验结构表明大分子质量核苷酸分别单独测得的分子离子峰强度,大于自混合物中测得的分子离子峰强度,如含

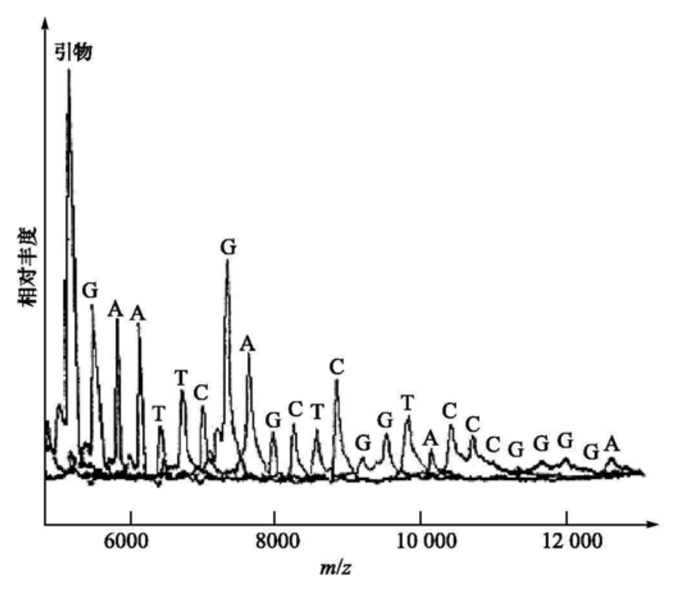


图 5.20　40 个碱基的模拟 Sanger 反应产物 MALDI 质谱图

36 个和 40 个碱基的寡核苷酸在混合物中，其分子离子峰太弱而无法测出。目前用于 DNA 测序的 MALDI-FT 或 ESI-FT 质谱仪，灵敏度和分辨率已大为提高，在这方面的应用已有很多报道。

2）酶解质谱测序法

DNA 酶解测序法与蛋白质酶解测序法完全相同：用专属特异酶在 DNA 分子中 3′位或 5′位依次切割碱基，用质谱法测量切割前后质量数的变化即可推测出切去碱基的种类，获得 DNA 的序列信息。如切去一个腺嘌呤（A）质量丢失 313.2Da，切去一个胞嘧啶（C）质量丢失 289.2Da，切去一个鸟嘌呤（G）质量丢失 329.2Da，切去一个胸腺嘧啶（T）质量丢失 304.2Da。为了精确测量质量差值，必须用高精度质谱仪，既可用 MALDI 质谱也可用 ESI 质谱。用 5′-核酸外切酶（如小牛脾磷酸二酯酶）和 3′-核酸外切酶（如蛇毒磷酸二酯酶）分别自寡核苷酸的 5′位和 3′位进行切割。例如，以一个 24 体为试样，以小牛脾磷酸二酯酶作为切割剂。反应 50 min 后，取消解液进行 MALDI 质谱分析，谱图见图 5.21，图中离子峰 exo N标记，N 代表切割数。由图可以看出各碎片峰强度相差很大，如 exo N6 峰很强，而 exo N10 峰则很弱，消解速率随碱基不同而异[28]。用酶解 MALDI-TOF 质谱测序法还可以分析含化学修饰碱基的寡核苷酸，这在传统方法中是不能的。

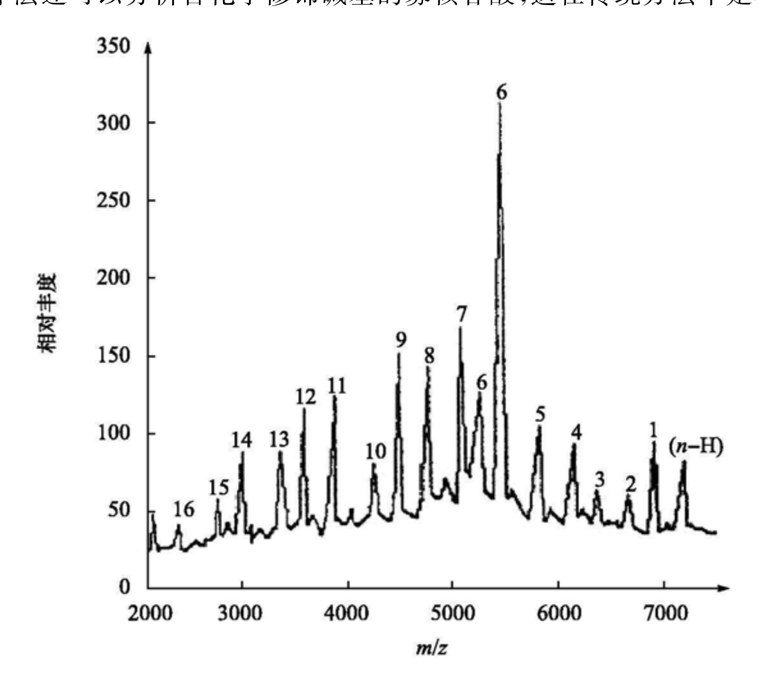


图 5.21　各碱基寡核苷酸的 CSP 消解后的 MALDI-MS 图

3）质谱裂解测序法[29]

质谱法测生物大分子的分子质量时，希望分子离子稳定，少发生裂解，以避免分子离子峰太弱，影响测定分子质量精度。在质谱裂解法测定 DNA 序列时，则希望获得足够多而强的碎片离子峰信息，以确定 DNA 序列。质谱裂解测定 DNA 序列宜用 MALDI-FT 质谱仪或 ESI-FT 质谱仪。在 FT 质谱仪中离子回旋共振腔俘获离子，延长离子在质谱仪中的停留时间，提供多级串联质谱碰撞机会以及 FT 质谱仪的高分辨，这些都有利于碎片离子的形成和鉴定，有利于 DNA 序列的测定。若用 MALDI-TOF 质谱仪，则宜用反射式 TOF 质谱仪，以延长离子飞行时间，增加裂解机会，同时采用延迟萃取技术以提高分辨率。

3. SNP 的生物质谱分析

目前，生物质谱已经实现对数十个碱基寡核苷酸的分子质量和序列测定，此技术可用于天然或人工合成寡核苷酸的质量控制。人类基因组有 30 亿个碱基，但真正与疾病有关的只是少数可变的基因。基因库中有一个很丰富的资源，即 300 万个单核苷酸多态性片段(SNP)，它是一类基于单碱基变异引起的 DNA 多态性，由于其位点丰富(约每一千个碱基一个多态性)，使得在鉴定和表征与生物学功能和人类疾病相关的基因时，可作为关联分析的基因标志。SNP 不一定要准确定位，关键是测定其在种群中出现的频率及其遗传和表型的关系，这便需要高通量的测定技术。生物质谱可以通过准确的相对分子质量测定，确定 SNP 与突变前多态性片段相对分子质量的差异，如碱基由 A 突变为 C 后，SNP 相对分子质量增加 24.025，突变为 G 时，增加 15.999，由相对分子质量的变化可推定突变方式。采用等位基因特异的延伸方法，结合质谱检测的方式，可以发展成为一种适合大规模、高通量的 SNP 分型方法。图 5.22 是用引物延伸法测 SNP 位点的实例，其中，图 5.22(a)是单一引物延伸后的 SNP 分型结果，是采用多重引物延伸反应后的 SNP 分型结果。从图 5.22 (a)可以看出，延伸引物和延伸产物之间的相对分子质量的差值可以确定一个 SNP 位点的碱基类型，如果进行 10 重 PCR 反应，一次实验就可以得到 10 个 SNP 位点的分型结果[图 5.22 (b)]。

一种快速而经济的方法是利用目前不断成熟的 DNA 芯片技术和质谱检测相结合，将杂交至固定化 DNA 阵列上的引物进行 PCR 扩增后，直接用质谱对芯片上 SNP 进行检测，该法将所需样品的体积由微升减至纳升，且有利于自动化和高通量的测定。Griffin 等[30]用浸入剪切分析(一种不经 PCR 而可以直接进行 SNP 分析的信号放大方法)结合 MALDI-TOF-MS 分析人基因组 SNP，该法既节省时间，又适于高通量分析，有利于特异性基因的定位、鉴定和功能表征。

DNA 在内环境中的温度、pH、机体代谢过程产生的超氧化物自由基、外环境

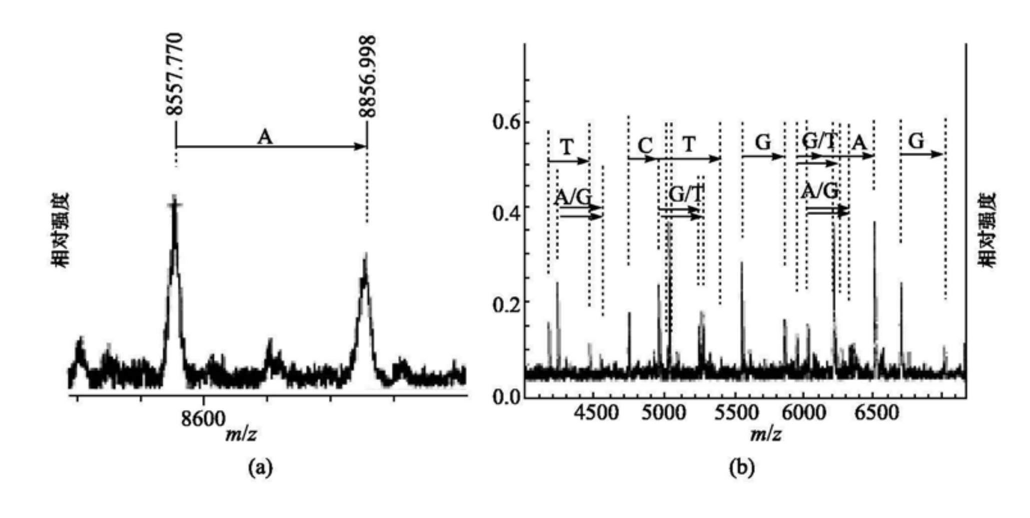


图 5.22　SNP 分型的 MALDI-TOF-MS 质谱图

(a) 单重 SNP 分型质谱图;(b) 10 重 SNP 分型质谱。图中箭头表示相应的延伸引物及其产物

中的各种化学物质(如烷化剂)、物理因素(紫外线等)等各种条件作用下,都可能发生损伤,若损伤不能及时修复,就会产生严重的生物学后果。DNA 损伤不仅包括 DNA 分子中的碱基,而且还包括脱氧核糖和磷酸,其中碱基损伤最厉害,造成的后果也最严重。碱基错配、电离辐射导致串联损伤、活性氧损伤、过渡金属 Cr(Ⅲ)复合物与 DNA 作用引发的损伤以及致癌剂对 DNA 损伤等的生物质谱研究多有报道[31]。

5.3.4　生物质谱在微生物鉴定中的应用

微生物的检验在环境监测、农产品分析、食品加工、工业应用、卫生机构维护及军事医学中都很重要,其重点主要在于微生物的分类鉴定上。由于微生物成分一般不是特别复杂,目前的 ESI 和 MALDI 技术已可以在其全细胞水平展开。

对于微生物全细胞蛋白质成分的鉴定,可用 MALDI-MS 或 ESI-MS 对裂解细胞直接检测,测定其全细胞指纹谱,找出种间和株间特异保守峰作为生物标记(biomarker),以此来进行识别。目的是通过大量指纹谱的测定,构建数据库,以实现对细菌等微生物的快速鉴定。细菌鉴定的另一个主要方法是利用细菌的脂肪酸图,即细菌脂类水解后释放出脂肪酸,将这些脂肪酸甲基化后分离检测所得到的图谱。传统上用气相色谱分离,火焰离子检测器检测,速度慢且麻烦,质谱软电离技术的出现大大提高了其鉴定速度。有报道用热裂解甲基化法结合离子肼质谱来区分 20 多种细菌[32]。除了生物标记和脂肪酸作图外,也有人用细菌糖类化合物作图,来作为细菌鉴定的依据,同时也用它来描述细胞所处的生理状况[33]。

生物除污(bioremediation)是利用微生物把污染物转换为低害或无害物。特

异降解微生物的选择及其代谢性能的鉴定是该技术的关键。MALDI-TOF-MS 多次被用于监测细菌的降解能力以及在外界刺激条件下细菌蛋白质组的变化[34]。

5.3.5 生物质谱在药物研究中的应用

1. 药物先导化合物的筛选

组合化学的产生同时也促使快速预测大量化合物对受体的激动或抑制效应以筛选先导化合物的方法的产生,上述过程即所谓的高通量筛选(high throughout screening,HTS)。高通量筛选通常利用分光光度检测 96 孔或 384 孔的形式。与分光光度法相比,质谱检测通常能够筛选混合物甚至整个库,同时还能提供结构的相关信息。

其中,第一类方法叫做亲和毛细管电泳质谱联用法(affinity capillary electrophoresis mass spectrometry,ACE-MS)。该法利用配体在毛细管电泳分离过程中迁移率的变化,实现同时测定单一受体的多种配体的亲和常数。最初的 ACE-MS 方法,包含受体和配基混合物的运行缓冲液上取样于毛细管中,每个配体的电泳迁移率随着与受体的配位作用而变化,然后使用 ESI-MS 或 ESI-MS/MS 鉴定。该项技术的优势是能够在几分钟内完成混合物中含量为 100～200 fmol 的配体筛选。此外,受体的纯度不需要非常纯净,配体的浓度也不必已知。第一个 ACE-MS 实例是筛选含 100 个多肽的肽库,考察其与万古霉素的结合能力。由于混合配基的溶解度有限,筛选更大的肽库(1000 个多肽)则需要起始通过亲和选择预浓缩和富集的方法。ACE-MS 方法的不足之处是受实验周期的限制,配体的结合解离速率需要很快,同时受体必须可溶并易获得。目前,对于所有 G-蛋白偶联受体,尽管可以使用胶束电色谱联用 ESI-MS 解决溶解问题,但有限的溶解度仍然无法适用于筛选。第二个模型系统是使用 Src SH2 结构域和多种磷酸化多肽实现了 ACE-MS 方法的进一步纯化。该系统在分离方法上使用毛细管等电聚焦(capillary isoelectric focussing,CIEF)取代毛细管电泳,从而浓缩了样品(100 倍)并提高了检测限。与 CE 分离相比,CIEF-ACE-MS 方法要求配体缓慢地结合解离速率,较实验运行时间短。CE 和 CIEF 的另一项不同之处是前者的受体和配体分别从毛细管上洗脱,而后者的受体和配体保持结合状态并且必须在导入质谱检测之前使之解离。

第二种方法也包含受体和多种配体在溶液中的结合反应,并使用质谱法监测,该法被称做脉动超滤质谱法(pulsed ultrafiltration mass spectrometry,PUF-MS)。PUF-MS 中,将多种配体和候选受体混合在一个超滤反应室中,并配备适当分子质量截留的滤膜。截流膜能够阻止受体或酶通过反应室进入质谱,仅允许配体通过进入装置被检测。在反应室加入配体和受体后,混合物首先由水清洗除去未结合的配体。之后,结合部分的配体用含解离剂的流动相洗脱至质谱检测。

第三种方法称做库亲和选择质谱法(library affinity selection mass spectrometry,LAS-MS),它依靠配体和靶标分子的亲和性筛选。LAS-MS 必须将受体、抗体或酶共价结合在固相载体上,以便选择性地从库中结合并除去化合物。结合的配体通常使用降低 pH 的方法使之释放。作为一种该法的替代方法,与 PUF-MS 类似,受体分子或靶分子在溶液中与化合物库相互作用,结合的化合物与未结合的组分通过分子排阻色谱分离。随后受体-配体复合物通过反相色谱除盐,在此条件下受体和配体发生解离。无论是哪种模式,洗脱的配基都要通过 ESI-MS 或 ESI-MS/MS 鉴定和结构确证。该法的主要优点是能够使用含靶分子的亲和柱结合柱切换系统进行自动化筛选。

总的来说,上述所有方法均无法区分构象变化导致的非特异性结合以及确定与结合亲和力相关的复杂化问题。在 ACE-MS 中排序的复杂性体现在可能发生配体向相同方向迁移,因此导致高亲和力与低亲和力配体的重叠。另一方面,使用 CIEF-ACE-MS、PUF-MS 和 LAS-MS 时,也会因为质谱中等物质的量的离子化假设而使排序难以确定。这些限制的结果是,上述方法仅通过首次筛选,随后再对最感兴趣的分析物进行 MS/MS 的结构确证分析。上述三种方法中,ACE-MS 是最快应用于制药工业的。

2. 早期药代动力学研究

药物研发过程中,大约有 40%的药物直至研发后期才发现药代动力学性质不佳,包括过低的生物利用度或短暂的体内半衰期等而被淘汰。因此,现代药物代谢动力学研究中,药物的早期药代动力学研究受到重视。

体外实验的方法使制药工业可以快速地筛选成千上万的新化学实体(new chemical entity,NCE),从而在化合物成为先导之前解决潜在的药代问题。这类筛选包括肠内吸收、代谢稳定性和血浆蛋白结合。这些实验均可利用质谱法进行。具代表性的是选择离子模式或全质量扫描用于直接测定整体化合物。所以,选用单四极杆(或 TOF)设备即足以满足这些体外方法的应用。通常,肠吸收能力以新化学实体在反应室中通过 Cac02 细胞单层或肠组织的渗透性来衡量。质谱法在测定混合化合物时体现了突出的优势,因此在这些模型中显著提高了通量。

NCE 的代谢稳定性时常通过体外肝脏微粒体酶进行评价。因为质谱允许使用快梯度(＜5min)的短柱,并可作为通用方法进行待测物的定量分析,故大大提高了通量。当合并了计算机控制和数据处理于该过程中时,代谢物稳定性研究的样品分析将发挥更大的潜力。围绕上述内容的自动化质谱方法已经开发出来。

体外筛选现已被用于确定可能影响化合物药代动力学的血浆-蛋白质的结合程度。白蛋白是血浆中丰度最高的蛋白质,也是主要的 NCE 结合蛋白。最为典型的是蛋白质结合实验通过平衡透析法或超滤法研究某种药物与蛋白质的结合情

况。近来,PUF-MS应用于多种化合物与人白蛋白结合的亲和力研究。此外,由于质谱具有很高的灵敏度,药物与血中其他蛋白质的结合以及生物基质中的稳定性同样可以利用相关的体内药物浓度进行评估。

通过不同的结构分类确定的化合物MS/MS特征谱图满足了不经液相分离而直接分析混合物中的多种化合物的高选择性要求。因此,一种增加体内药代样品分析通量的策略已开始用于同时分析多个化合物,即箱式给药(cassette dosing)。目前最大的分析速度是在两天内同时分析11个NCE。分别在一个生命周期与单次给药方式相比,提高分析通量4～19倍。但该方法的一个限制是潜在的药物间相互作用(如代谢酶的抑制物)。此限制能使用混合分别单次给药后的生物样品而消除。给药后样品混合比箱式给药需要更多的动物资源,但样品分析时间比分别给药的分析方法还是显著减少了。箱式给药和给药后合并方法的第二个缺陷是可能导致定量错误,即一个化合物的代谢物可能与另一个化合物在给药后的混合物中被同时鉴定。该问题可以通过细致选择给药的化合物种类而消除。无论哪种方法,化合物选择数量越大,共洗脱组分的相似性就越近。这可能是由于离子化的竞争导致定量的不准确。

质谱技术不但影响了药物发现阶段,同时对于开发阶段,数千个临床样品也需要在短短几个月内完成分析。唯独依靠质谱提供的高选择性通过,同时给予同一动物不同的给药途径和不同种类的同位素药物,才为确定化合物的生物利用度提供了可能。因为不同同位素含量的药物具有不同的相对分子质量,可以通过HPLC-API-MS/MS同时检测它们。LC-MS技术已经成为优化药物候选物药代动力学属性的一项常规工具。

3. 药物代谢

近年来质谱在药物代谢方面的研究进展迅速。其主要研究药物在体内过程中发生的变化,阐明药物作用的部位、强弱、时效及毒副作用,为药物设计、合理用药提供实验和理论基础。特别是采用生物技术获得的大分子药物的体内代谢研究,更是传统的研究手段难以解决的难题。体内药物或代谢物浓度一般很低,而且很多情况下需要实时检测,而质谱的高灵敏度和高分辨率以及快速检测则为代谢物鉴定提供了保证。LC-ESI-MS-MS在这方面有独特的优势,由于对液态样品和混合样品的分离能力高,可通过二级离子碎片寻找原型药物,并推导其结构。LC-ESI-MS-MS已广泛地应用于药物代谢研究中一期生物转化反应和二期结合反应产物的鉴定、复杂生物样品的自动化分析以及代谢物结构阐述等。例如,在血管舒缓激肽(BK)抑制剂B201的体内代谢研究中,使用了以离子阱质谱仪选择离子监测(SRM)模式监测子离子为基础开发的一种高度灵敏的LC-ESI-MS/MS方法,用于分析体外和体内血浆中的B201。B201是血管舒缓激肽(BK)的第三代竞争

性拮抗剂，能够与 BK 竞争结合 BK 受体，具有很高的活性[35]。为建立精确可靠的多肽药物定量方法，须选择结构与其相似的 P 物质作为 B201 的内标物。二者在电喷雾离子源的多电荷质谱图及其碰撞诱导解离(CID)后的二级图谱，见图 5.23 和图 5.24。

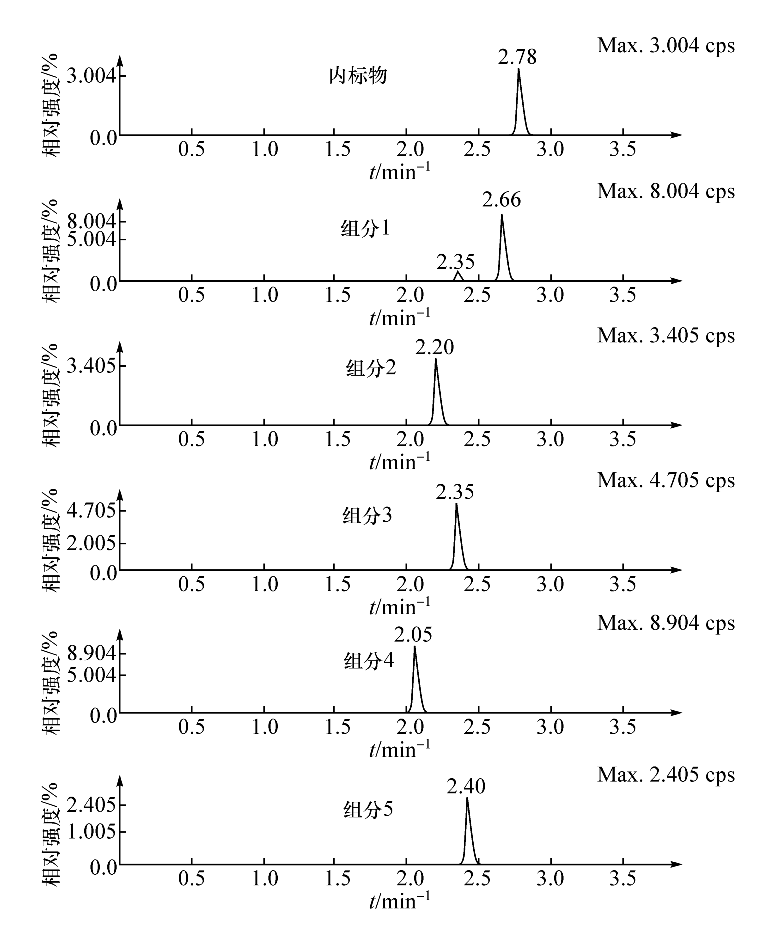


图 5.23　利用液质联用方法结合在线提取系统分析 5 合 1 给药(箱式给药)的多级反应监测(MRM)色谱图

图 5.25 表明此种基于液质联用技术的检测方法的特异性能满足多肽 B201 的药物动力学研究。该分析方法已用于 B201 的临床前动物药代动力学研究，结果表明该多肽在小鼠中呈现二房室模型的代谢行为，半衰期较长，同时也检测了口服药物的生物利用度仅有 1%。

图 5.24 B201 和 P 物质的电喷雾质谱图

(a) B201 全质量范围扫描图谱;(b)源内裂解模式 B201 三电荷离子质谱图;

(c) P 物质全质量范围扫描图谱;(d) P 物质双电荷离子质谱图

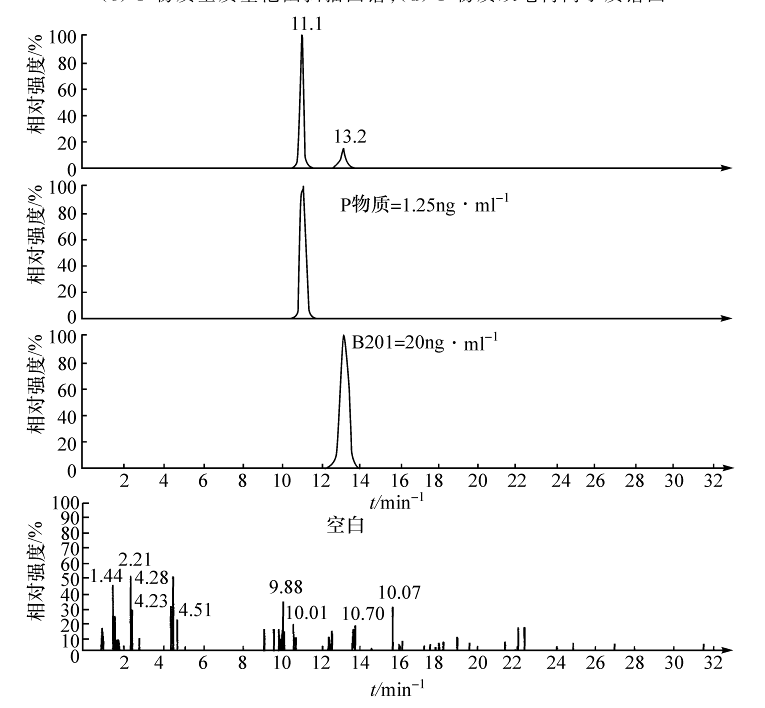


图 5.25 小鼠血样中 B201 和 P 物质及空蛋白血浆在 SRM 模式下的总离子流色谱图

5.3.6　其他应用

质谱在医用材料,如人造血、新型生物假肢、人造皮肤等研究中也有较大的潜在用途。最主要的是分析检测这些材料中活性物质的纯度、浓度及结构等,这是生物材料质量控制的重要依据之一。

参 考 文 献

[1] Tanaka K,Ido Y,Akita S et al. *Proc. Second Japan-China Jiont Symposium on Mass Spectrometry*. Japan, 1987. 185
[2] Yoshida T, Tanaka K, IdoY et al. *Mass Spectr*. Japan, 1988,**36**:59
[3] Tanaka K,Waki H Ido Y,Akita S et al. *Rapid Commun. Mass Spectr*. 1988,**2**:151
[4] Karas M, Hillenkamp F. *Anal. Chem*. 1988,**60**:2299
[5] Fenn J B, Mann M, Meng C K et al. *Science*. 1989, **246**(4926):64
[6] Wiley W C, Mclaren J H. *Res. Sci. Instrum*. 1955, **26**: 1150
[7] Yost R A, Enke C G. *Anal. Chem*. 1979, **51**: 1251A
[8] Schwartz J C, Jardine I. *Methods Enzymol*. 1996, **270**: 552
[9] Marshall A G, Hendrickson C L, Jackson G S. *Mass Spectrom. Rev*. 1998, **17**: 1
[10] Barber M, Bardoli R S et al. *Chem. Commum*. 1981,325
[11] Barbara S L, Charles N M. *Massspectromtry of Miological Materials*. New York, Marcel Dekker,1998
[12] Arnott D, O'Connell K L, King K L et al. *Anal. Biochem*. 1998,**258**:1
[13] Dainese P, Staudenmann W, Quadroni M et al. *Electrophoresis*. 1997, **18**:432
[14] 陈晶, 付华, 陈益. 有机化学. 2002, **22**(2): 81
[15] Wei K H,Yang S C,Cai Y et al. *Proccding of Internationg Eighth Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis*. Peking,China,1999. B67
[16] Stensballe A, Andersen S, Jensen O N. *Proteomics*. 2001, **1**:207
[17] Kim H J, Song E J, Lee K J. *J. Biol. Chem*. 2002, **277**:23193
[18] Zhang H, Li X J, Martin D B et al. *Nat. Biotechnol*. 2003,**21**:660
[19] Gygi S P, Rist B, Gerber S A et al. *Nat. Biotechnol*. 1999, **17**:994
[20] Rigaut G, shevchenko A, Rutz B et al. *Nat. Biotechnol*. 1999,**17**:1030
[21] Forler D, Kocher T, Rode M et al. *Nat. Biotechnol*. 2003, **21**:89
[22] Sottani C, Fiorention M, Minoia C. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 1997, **11**: 907
[23] Papac D I, Wong A, Jones A J S. *Anal. Chem*. 1996, **70**: 455
[24] Mechref Y, Novotny M V. *Anal. Chem*. 1996, **70**: 455
[25] Tang K. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 1994, **8**: 727
[26] Mclaffery F W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 1996, **7**: 1266
[27] Fitzgerald M C. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 1993, **7**: 895
[28] Bentzlev C M. *Anal. Chem*. 1996, **68**: 2141
[29] Mclaffery F W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 1996, **118**: 9352
[30] Griffin T J, Hall J G, Prudent J R et al. *PIAS*. 1999, **96**: 6301
[31] Bourdat A G,Gasparutto D,Cadet J. *Nucleic Acids Res*.1999,**27**(4):1015

[32] Welhan K J, Domin M A, Scannell D E et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, **12**:176

[33] Fox K F, Wunschel D S, Fox A et al. *J. Microbiol. Methods.* 1998, **33**(1):1

[34] Dukan S, Turlin E, Biville F. *Anal. Chem.* 1998, **70**(20):4433

[35] Wan Y F, Kenneth K C, Joseph M C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, **28**:601

第 6 章　微流控分析

6.1　微全分析系统和微流控分析概述

微全分析系统(micro total analysis system,μTAS)或称芯片实验室(lab on a chip,LOC)是一个跨学科的新领域,是分析化学、微机电加工学、计算机学、电子学、材料科学、生物学及医学等多学科的交叉。它将样品的预处理(包括过滤、浓缩、衍生、样品的混合、反应)以及样品的进样、分离和检测等常规实验室操作集中在平方厘米级的芯片上完成,实现了化学与生物分析系统的整体微型化、自动化、集成化与便携化。

微全分析系统体积的微型化使其分析速度加快,自动化和集成化程度提高。人类基因组计划的提前完成,即归功于 96 通道微芯片电泳的运用[1],随后发展的 384 通道的阵列毛细管电泳微芯片,使分析通量得到进一步的提高[2]。

自从 Manz 和 Widmer 于 20 世纪 90 年代初首次提出微型全分析系统的概念以来[3],该领域已经发展成为当前世界上最活跃、最前沿的科技领域,而其核心技术则是以微流控技术(microfluidics)为基础的微流控芯片[4,5]。

6.1.1　微流控分析系统的特点

微流控芯片是通过微加工技术,将微通道、微泵、微阀、微储液器、微电极、微检测元件、窗口和连接器等功能单元集成在平方厘米大小的芯片材料上。微流控芯片在装置上的主要特征是其微纳流体的有效结构(包括微通道、反应室和其他某些功能部件)至少在一个维度上为微米级尺度。与宏观尺度的试验装置相比,微流控芯片的微米级结构显著增大了流体环境的面积/体积比例,产生了特殊的效应,包括:层流效应、表面张力及毛细效应、快速热传导效应和扩散效应。这些特殊效应使得微流控芯片的分析性能在很多方面超过了宏观体系下的分析性能。性能改善主要表现在:①分析系统的微型化;②分析系统的集成化、自动化;③分析效率显著提高;④试样和试剂消耗显著下降;⑤实现高了通量的分析。

微流控分析系统体积的微型化带来分析性能的改善会降低分析成本,降低分析过程产生的废物对环境的污染,并可以制备一次性用的分析设备。然而,系统的微型化必然会增加芯片制作的难度,微通道表面性质的微小变化会对分析性能产生很大的影响,同时体积的微型化也会在一定程度上增加操作难度和检测难度。

6.1.2 微流控芯片的加工

微流控分析系统的核心是微流控芯片,而微流控芯片的最基本特征是微米级的微通道系统。在此尺度下,一般的机械加工手段难以满足要求,因此,需要与之相匹配的微加工技术。单晶硅是最先尝试使用的芯片基材,这主要是因为当时单晶硅是微电子行业的基础材料,加工工艺和相关设备完善。但是单晶硅在介电性、光透明性及抗腐蚀性、成本方面并不能很好的满足化学分析的要求。石英和玻璃则弥补了单晶硅在电学和光学性能方面的不足,并且价廉、易得,加工技术与硅片加工技术相似,也可采用微机电加工技术中的光刻和蚀刻技术。应特别指出的是玻璃基材,它是一种化学分析和测量容器的传统材料,因此,很快成为微流控系统的主流基材之一。

玻璃和石英等无机材料芯片的加工过程包括光刻和蚀刻、打孔、键合,而这些过程由于加工技术本身的特殊要求或材料本身的性质,使得产生了对加工环境的要求高、加工设备昂贵、加工周期长、加工难度大、难以批量生产等不利因素,促使科学工作者把目光投向了高分子材料。高分子材料种类繁多,可供选择的余地大,加工成型方便,价格便宜,又有很好的透明性和介电性,成为目前除玻璃材料之外的另一类主要芯片材料,在一次性芯片的开发中占主导地位。Soper 等[6]认为聚合物材料作为芯片基材需考虑的指标有:良好的光学性质、易加工、对分析物惰性、良好的电和热特性、易于进行表面修饰和改性。

在高分子聚合物中又可以分为两类。一类是室温下为固体的硬质聚合物,最常使用的是聚碳酸酯(polycarbonate,PC)、聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate,PMMA)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(poly ethylene terephthalate,PET)等,这类高聚物芯片的加工多采用热压法、激光烧蚀法等。另一类是弹性聚合物,具有代表性的是聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane,PDMS),是当前应用最为广泛的微流控芯片材料。PDMS 具有独特的弹性、良好的透光性、介电性、化学惰性、无毒、容易加工和价廉等优点,由模塑法和软光刻法即可制备 PDMS 芯片。PDMS 由单体和交联剂前体热交联而得,反应条件温和,100℃以下即可。此外,由 Lago 等[7]提出了直接打印法,利用绘图软件设计管道构型,管道处设为白色,而其他地方设为黑色;利用激光打印机将管道形状打在透明胶片上,管道的深度由碳粉的厚度决定;最后利用热层合机制得芯片。这种芯片制备方法大大简化了芯片制作过程,降低了芯片成本,并可方便地制作适用于不同用途的分析芯片。这种打印芯片已经用于生化物质的分离[8]、微混合器的制作[9]以及微酶反应器的集成等[10]。

6.1.3 微流控分析的应用领域

随着微流控芯片加工技术的不断发展,微流控分析系统由于其不同于宏观体

系的优异分析性能，已经渗透到疾病诊断和治疗、新药开发、分子生物学、临床医学、司法鉴定、食品卫生、环境监测、生物战剂的侦检等各个领域，其重点应用领域是生命科学领域。随着人类基因组计划的完成，人类已经进入后基因组时代，单核苷酸多态性分析、基因表达分析，基因变异分析和蛋白质组分析将变得更为重要，而这些正是生物分析化学所面临的重要问题。由于微流控分析系统具有大规模平行处理能力，使它可能成为后基因组时代的支撑性技术之一。微流控技术可以实现在一个高通量芯片上同时对多个患者进行多种疾病的快速检测与疾病早期诊断，将在未来的临床诊断中发挥重要作用。

6.2　微流控芯片上的生物分析化学技术

6.2.1　微流控芯片上电泳分离技术

芯片毛细管电泳（microchip capillary electrophoresis，Chip CE）是在硅、石英、玻璃、高聚物等芯片的微通道或色谱柱中，以电场为驱动力，借助于离子或分子在电迁移或分配行为上的差异，对复杂试样中的多种组分进行高效分离的技术。在分离原理上，它与常规毛细管电泳相似，但是进行分离分析的硬件却有质的区别，因此产生了一系列全新的分析技术，相关的分离理论也有了新的内涵。芯片作为其硬件的核心，是通过微加工技术，在平方厘米大小的玻璃等材料上加工出宽度为微米、长度为厘米级的微通道网络和由其他功能单元组成的进样、分离、反应乃至传感系统的集合体，并在芯片上集成一定的外部设备（如电源、光学或电化学检测器等），形成一个完整的芯片毛细管电泳分离分析系统。图 6.1 为最简单的十字交叉芯片毛细管电泳分析系统示意图。

芯片毛细管电泳分离分析的基本原理与常规毛细管电泳相似（可参看第 4 章电泳中的毛细管电泳和常规毛细管电泳专著[11～13]），但在平面芯片的微通道中进行高效、快速的电泳分离有其特殊性。常规毛细管电泳中所使用的圆形截面石英毛细管，由于通道的面积/体积比小，外表又涂覆有聚酰亚胺涂层，使得电泳时所产生的焦耳热在没有强制冷却的条件下不能有效地散热，从而在毛细管内产生温度梯度，使分离效率下降，难以通过提高场强来提高分离效率和分离速度。Jansson 等[14]从理论和实验角度证明了矩形分离管道与传统的圆形毛细管相比，具有比表面积大、散热快、效率更高的特点。因此，采用较小管道尺寸（深度常为 10～20μm，宽度为 50μm）的微流控系统可以实现更高的理论塔板数。总的来说，①分离长度下降，分离电压上升，均可使分析时间减少；②分离电压上升，理论塔板数增加；③管道尺寸降低，焦耳热减少，理论塔板数增加。芯片微通道的截面呈长方形或梯形，通道的面积/体积比大，加上大面积玻璃片基片的散热效果好，这样就能采用较高的场强对试样进行快速分离。

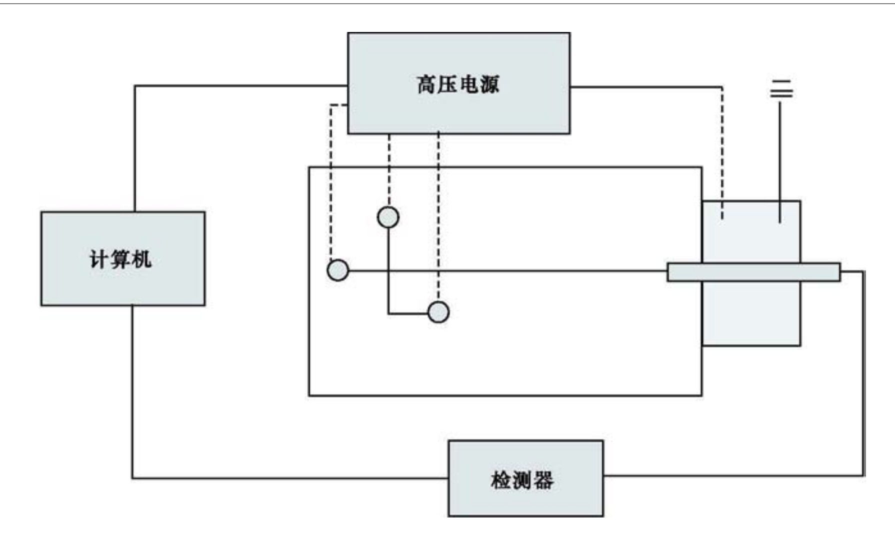


图 6.1 芯片毛细管电泳分析系统

在芯片上进行毛细管电泳分析主要具有以下特点：

(1) 采用各种芯片加工技术，可以方便地在玻璃、石英、塑料、硅片上加工出微米级的分离通道，或制备出诸如开口柱、填充柱和整体柱等各种新式的毛细管电色谱柱。

(2) 以电场为流体的驱动力，通过调节场强的大小、方向，可方便地实现小体积(皮升或纳升)进样、分离、汇流、分流等操作，无需机械泵和机械阀，符合微型化、集成化、自动化的要求。

(3) 可采用区带电泳、凝胶电泳、等电聚焦、等速电泳、胶束电动色谱等不同的分离模式，实现从小无机离子至生物大分子的快速分离，与激光诱导荧光、电化学和质谱等高灵敏检测器联用，可以方便地进行各种复杂样品的微、痕量成分的分离与测定。

(4) 借助 MEMS 技术，还可以在芯片上加工出各种流动分析单元，形成以电泳分离为中心的微型化、集成化和自动化的微全分析系统。

正是由于以上优点，自瑞士科学家 Manz 等[15]报道第一篇关于芯片毛细管电泳的文章以来，在 μTAS 发展的十多年，芯片毛细管电泳得到了飞快的发展，成为 μTAS 领域中最令人瞩目的一个分支[16,17]。尤其是近年来，芯片毛细管电泳对 DNA、多肽、蛋白质等生物大分子所表现出来的高分辨、高速、高通量的分离分析能力，使它成为后基因组时代最有希望攻克蛋白质组学研究、基因与临床诊断、药物筛选等难题的分离分析手段之一。

与毛细管电泳相似，芯片毛细管电泳也有区带电泳、凝胶电泳、等电聚焦、等速电泳、胶束电动色谱、电色谱等不同的分离模式，它们在生化分析中的应用领域也

各不相同,下面分别加以介绍。

1. 芯片毛细管区带电泳

区带电泳是芯片毛细管中最常用的一种分离模式,是根据不同分析物电泳淌度的差异实现组分间的分离。由于该分离模式所用的分离介质简单,分离速度快,对于离子型化合物有很好的分离能力,因此,早期的芯片毛细管电泳基础研究中大多采用这种分离模式。在目前有关小分子质量离子型化合物的分离分析中,这一分离模式仍然占主导地位。芯片毛细管区带电泳在生物分析中主要用于分离氨基酸、荧光染料、手性氨基酸等小分子化合物的分离。此外,芯片区带电泳也可以用于蛋白质等生物大分子的分离,例如对均相免疫反应的混合物进行分析(参见6.3)。

Rodriguez 等[18]以区带电泳(CZE)为分离模式,以荧光素异硫氰酸酯(FITC)与抗人免疫球蛋白 IgG(抗人 IgG)的反应混合物为试样,对常规毛细管、短毛细管和芯片通道中的电泳分离性能做了很有意义的对比研究,见表 6.1。在玻璃芯片上进行 CZE 时,柱效和分离速度都比在石英毛细管中的分离优越得多。

表 6.1　常规毛细管、短毛细管和芯片通道中的电泳分离性能

参数	玻璃芯片	14cm 石英毛细管	47cm 石英毛细管
通道长度/cm	4.5	14	47
分离长度/cm	2.8	6	35
场强/($V \cdot cm^{-1}$)	526	268	383
迁移时间/s	11.22	44.7	152
理论塔板数/N	49 583	41 816	27 750
每伏塔板数/(V^{-1})	19.83	11.15	1.54
塔板高度/μm	0.56	1.43	12.61
线速/($cm \cdot s^{-1}$)	0.25	0.13	0.23
表观迁移率/($10^{-4} cm \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$)	4.74	5.00	6.01

芯片通道上的高柱效是因为玻璃芯片的散热性能好,且允许施加较高的电场,而 47cm 石英毛细管上相对低的柱效与长毛细管中组分的长迁移时间造成的过度分子扩散有关。Rodriguez 等[18]的对比实验中显示的芯片毛细管电泳的优势应具有普遍意义。

同常规毛细管区带电泳一样,芯片毛细管区带电泳中微通道的表面性质直接影响电渗流的性质以及通道表面与溶质的相互作用,对分离和分析产生不可忽略的影响。因此,人们常对微通道表面进行改性或动态修饰,以实现更好的分离分

析。芯片毛细管区带电泳的表面修饰和处理可参考相关综述[19]，如可用紫外光照、等离子体氧化、化学氧化处理等来改善 PDMS 芯片的电渗流性质，实现氨基酸荧光衍生物的分离。Dou 等[20]在分离介质中添加 MES 来动态修饰，实现了糖类和葡萄糖氧化酶的分离。

2. 芯片胶束电动毛细管色谱

胶束电动毛细管色谱（micellar electrokinetic capillary chromatography，MECC）是使用已带电的、能在电场作用下定向运动的表面活性剂胶束为准固定相的一种电动色谱分离技术，溶质分子除了在电场下运动之外，还在水相和胶束相之间参与分配，从而既可以分离离子型化合物，也可以分离不带电荷的中性分子，在常规毛细管电泳中有着广泛的应用。迄今为止，有关芯片 MECC 的报道不多。Moore 等[21]首先将 MECC 技术移植到芯片毛细管电泳中，以中性染料香豆精 440、香豆精 450、香豆精 460 为分析对象，采用 pH9.0 的硼酸钠-十二烷基磺酸钠-甲醇为运行缓冲溶液，在 1.3cm 的直管道内用 $500V \cdot cm^{-1}$ 的场强，3s 内实现了三者的分离。在生物分析化学领域，Culberston 等[22]用 $770V \cdot cm^{-1}$ 的场强，在 11.9cm 的盘形通道中用 MECC 法在 165s 内分离了 19 种荧光标记的氨基酸。由于缓冲溶液的离子强度一般都比较大，MECC 比 CZE 使用的场强小，但由于芯片良好的散热作用，芯片 MECC 仍然可以在较高的场强下进行高柱效和高速度分离，但与芯片区带电泳相比，在分析速度上仍稍逊一筹。

3. 芯片凝胶电泳

毛细管凝胶电泳（capillary gel ectrophoresis，CGE）是毛细管电泳的重要模式之一。CGE 分离是在填充有凝胶或其他分离筛分介质的毛细管中进行。筛分介质拥有或可形成具有一定孔径范围的网状结构，当带电分子的体积分布处于筛分介质的孔径范围内，则它们在筛分介质中电泳时，会因排阻作用的不同而具有不同的迁移速率，到达检测器的时间也不同，实现了分离目的。由于凝胶流动性差，可以避免对流分散、减少分子扩散和管壁对分子的吸附，还能抑制不具分离能力的电渗流，因此 CGE 具有很高的分离能力，成为蛋白质、多肽、寡核苷酸、DNA 等生物大分子分离分析的有力工具。人们较早将这一分离模式移植到了芯片毛细管电泳中。芯片凝胶电泳也是在生物分析化学中应用范围最广的微流控分析技术。

芯片 CGE 的筛分介质有线性聚合（交联度 C 为零）的聚丙烯酰胺凝胶、羟烷基纤维素（羟乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素）等的筛分缓冲溶液。Effenhauser等[23]最早报道的芯片凝胶电泳，将加有丙烯酰胺和引发剂过硫酸氨的 TBE 缓冲溶液（三羟甲基氨基甲烷-硼酸＋EDTA）充入未经任何化学处理的玻璃芯片通道，使丙烯酰胺在通道内聚合为 10％T 的线性聚丙烯酰胺凝胶。它在

1.3cm的分离通道内，以2300V·cm^{-1}的场强，在45s内分离了10～25个碱基对的寡核苷酸硫代磷酸酯混合物，理论塔板数达到200 000。Wolley等[24]进行了最早使用聚丙烯酰胺凝胶芯片电泳快速DNA测序的实验，他们用双官能团试剂对通道表面进行硅烷化处理，然后将含有丙烯酰胺单体和脲的TBE缓冲溶液与引发剂(过硫酸铵)与管壁上的MAPS烯基进行共聚作用，使凝胶被键合到管壁上，制成9%T的线性聚丙烯酰胺凝胶筛分介质。用此芯片作DNA测序，分离通道长3.5cm，场强250V·cm^{-1}，可在7min左右使DNA(M13mp18)单碱基分辨(R>0.5)达到200碱基以上，塔板高度达到1.1×10^{6}。羟烷基纤维素类的线性高聚物在缓冲溶液中缠绕成网络结构，缠绕程度决定于羟基纤维素的性质、浓度和缓冲溶液的性质，这种筛分介质被称为动态筛分介质。动态筛分介质与一般缓冲溶液的使用方法一样，在使用时将一定浓度的筛分介质加入到缓冲溶液中即可，但是这类流动性高聚物溶液的分离效率比不上聚丙烯酰胺等凝胶介质。例如，Effenhuaser等[25]利用含有0.5%羟丙基纤维素的三羟甲基氨基甲烷-硼酸盐体系为筛分介质，在聚二甲基硅氧烷芯片的3.5cm长的分离通道中，以500V·cm^{-1}的场强，在200s内分离了ΦX-174/HaeIII DNA的限制性酶解片段，对620bp的片段分离度仅为46 000。动态筛分介质与聚丙烯酰胺类这类通过化学交联形成网络结构的筛分介质相比，具有制备简单、使用灵活方便、制备的凝胶柱可以重复利用等优点，在芯片凝胶毛细管电泳中应用较多，特别适合于复杂通道体系的应用。例如，在集成了柱前酶解反应器[26]和PCR[27]的毛细管电泳芯片进行DNA分析时，或在阵列通道毛细管芯片[28]进行高通量DNA分离分析时，几乎都是使用这类筛分介质。

4. 芯片等电聚焦

等电聚焦(isoeletric focusing，EF)是根据蛋白质、肽等两性离子等电点的差异进行分离分析的电泳分析法，具有很高的分离能力。两性电解质在分离介质中的迁移形成pH梯度，具有不同等电点的蛋白质按照这一梯度迁移到相应等电点位置，并在该点停下，由此产生一条非常窄的聚焦区带，然后再施加一定的驱动力如化学移动、压力移动和电渗移动，使聚焦后的组分区带向检测器窗口移动。在芯片微通道内进行等电聚焦，可以施加很高的场强，从而实现高效、高速分离。Hofman等[29]首先在微流控芯片上实现了等电聚焦，并认为最适于芯片毛细管等电聚焦的是电渗移动法，因为电渗移动谱带的一步等电聚焦与芯片的微型化、集成化和自动化的要求符合，并用一步等电聚焦法在30s内实现了Cys-5标记的4种肽的分离。Mao等[30]在涂有线性聚丙烯酰胺的石英通道内，采用CCD成像技术，对4cm通道内的等电聚焦过程进行了实时检测。这种方法既可以观测到聚焦的动态过程，又避免了聚焦后借助驱动力送至检测窗口检测的缺点，但是检测设备成本高。

6.2.2 微流控芯片电色谱分离技术

毛细管电色谱(capillary electrochromatography,CEC)是在毛细管中填充或在毛细管内壁涂覆、键合色谱固定相或原位制备色谱固定相,利用电渗流或电渗流结合压力推动流动相,根据各组分在固定相和流动相间分配系数的不同以及电泳速率的差异而达到组分分离的一种微柱液相色谱法,它集中了高效液相色谱(HPLC)的高选择性和毛细管电泳的高效性,在复杂样品的分析中具有很大的潜力。但和毛细管电泳相比,CEC 在微流控芯片上应用较少,芯片电色谱按固定相的形态分为开口管柱、填充柱和整体柱。

1. 填充柱芯片电色谱

常规的 CEC 法中,填充柱的制备常用压力填充法和电动填充法,这些方法都需要制作固定填充物的柱塞,而柱塞的存在会引起气泡的产生,并引起柱效的下降。

制作芯片电色谱柱塞的方法与常规 CEC 不同,一般是通过微加工技术直接在芯片通道内形成围堰、微柱阵列和锥形通道等结构以固定填充床。由于芯片电色谱中并不存在一个传统意义上的柱塞,也就不存在“柱塞效应”,这已经成为芯片电色谱的一个突出优势。Jindal 等[31]使用溶胶-凝胶技术在芯片通道内固定微粒的制作方法如下:首先在石英基片上刻蚀十字形通道,然后将一 PDMS 片可逆封接在石英基片上,用来限制固定相的位置,将固定相 C4 硅胶微粒加到溶胶-凝胶溶液中,用抽真空的方法将其引入限定的通道,待共凝胶化后,除去 PDMS 片,硅胶微粒就被固定在微通道内,最后将一洁净的 PDMS 片和石英片用氧等离子体处理后,不可逆封接在一起即得到电色谱芯片,并分离了三种肽。

填充柱固定相负载容量大,可供选择的商品化填料种类多,但由于固定相微粒填充的困难,使得在芯片上制备重复性好和柱效高的填充柱并不容易。

2. 开口管柱芯片电色谱

芯片电色谱的开口柱是通过化学修饰方法在微通道内壁形成色谱固定相而制得的。Jacobson 等[32]首先在芯片上实现了电色谱的分离方式,他们采用玻璃基质芯片,在微通道内壁直接键合聚硅氧烷,制得 CEC 反相键合开口柱,在不到 3min 内实现了 3 种香豆素的分离。Soper 等[33]通过两步制作方法在 PMMA 芯片通道内壁形成十八烷基修饰的表面,成功地反相分离了小片段的双链 DNA。与填充柱电色谱芯片相比,开口管电色谱芯片制作简单,但固定相的负载量小,光学检测的光程短,在应用上受到一定的限制。

3. 整体柱芯片电色谱

通过微加工或原位聚合等方法可以在微流控芯片通道中直接形成固定相，从而避免了填充的困难，也不需要制备柱塞，这样制备的色谱柱称为整体柱或称连续床。整体柱又可以分为微加工整体柱电色谱和多孔聚合物整体柱芯片电色谱。

1)微加工整体柱电色谱

Regnier 研究组[34]利用微加工方法在通道内形成有序排列整体载体结构(collocated monolith support structure，COMOSS)的电色谱整体柱，如图 6.2 所示。这种结构在石英基片上利用深度反应离子刻蚀技术一次形成，然后对微通道壁用氨丙基三乙氧基硅烷溶液进行硅烷化处理，在引入聚苯乙烯磺酸钠溶液时静电吸附到氨化的表面，形成适合反相分离的疏水层。石英的 COMOSS 柱的成本昂贵，该研究组[35]又研制了价格低、制作快速的 PDMS 材质的 COMOSS 柱电色谱。分离 4 种 FITC 标记的多肽，140s 内实现基线分离，柱效达 620 000m^{-1}。

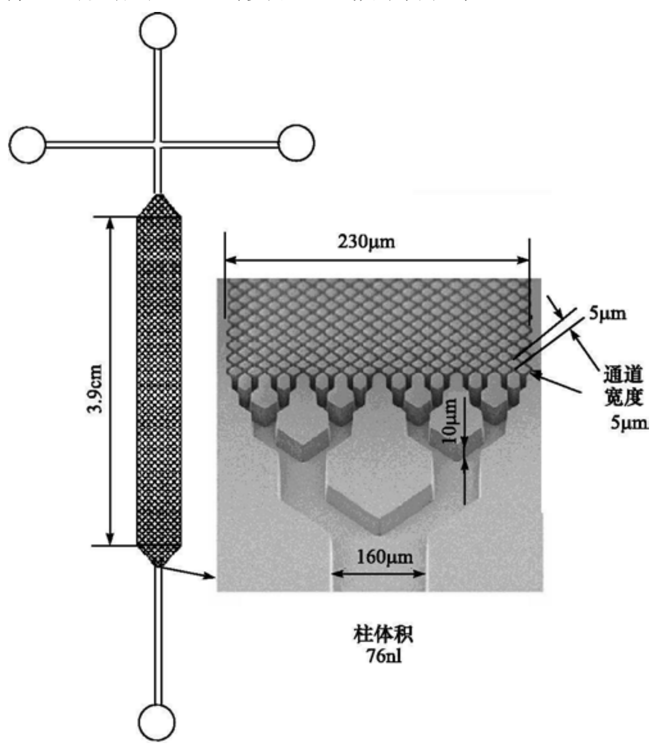


图 6.2　COMOSS 分离柱示意图

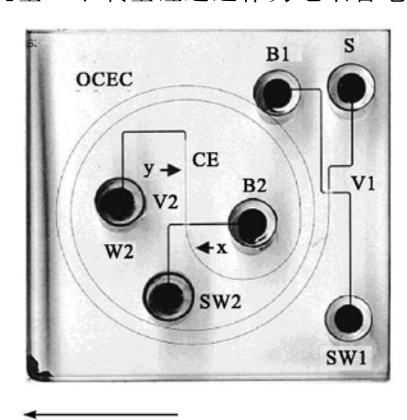
2）多孔聚合物整体柱芯片电色谱

聚合物单体在开口通道内发生原位聚合反应制备芯片整体柱，既避免了填充柱电色谱填充固定相的困难，又避免了高精度的湿法刻蚀，还丰富了毛细管电色谱柱的种类，是一种很有吸引力的方法。聚合物反应的引发可通过热诱导和光诱导，其中光诱导聚合反应具有反应快、容易控制等优点。Throckmorton 等[36]利用紫外线诱导聚合反应，在玻璃芯片通道特定的区域内形成丙烯酸酯类的多孔聚合物整体柱。该整体柱用于分离多肽和氨基酸，6 种多肽在 45s 内被分离，柱效高达 600 000m^{-1}，其分离速度和分离效率均好于常规的毛细管电色谱。这种整体柱制作简单，重复性和耐用性好，并可以在选定的通道段引发光聚合反应。

6.2.3　微流控芯片上的二维分离

高分辨率的分离方法对于多组分复杂试样的分析十分重要，然而，一种分离方法所能达到的分离度会随着试样成分复杂性的增加而降低。一般而言，HPLC 的峰容量在 20～100，常规毛细管电泳在 50～150，而对于成分十分复杂的生物样品，仅仅运用一种分离模式的一维分离，无论 HPLC 或 CE 都难以达到令人满意的结果。若将几种基于不同分离原理的分离方法串联起来组成一个多维分离系统，则该多维分离系统的峰容量可以表示为 $n_c = n_i n_j \cdots$[37]，峰容量将大大增加。

Ramsey 小组[38]首先报道了胶束毛细管色谱和毛细管区带电泳（MEKC-CE）及毛细管电色谱和毛细管区带电泳（CEC-CE）偶联的二维分离系统，如图 6.3 所示。CEC-CE 二维分离系统采用玻璃芯片，结构非常简单，以 25cm 长的多边盘形十八烷基三甲氧基硅通道作为毛细管电色谱的分离通道，与 0.8cm 长的直形毛细



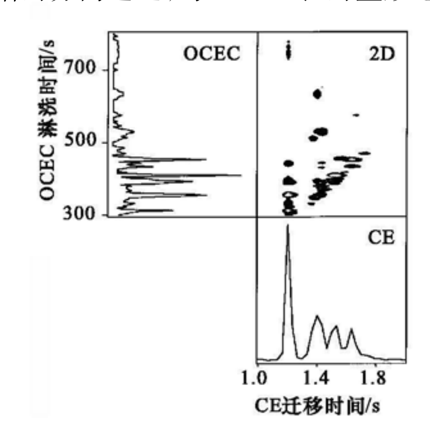


图 6.3　CEC-CE 芯片二维分离通道网络结构及对酪蛋白胰朊酶解产物的二维分离图

管区带电泳通道垂直排列，实现了对荧光标记的酪蛋白胰朊酶解产物进行分离分析。

二维分离成功的关键之一是第二维的采样频率与第一维分离的峰宽度必须相匹配。在上述实验中，采用门式进样技术，以每 3.2s 一次（每次采样持续 0.2s）的频率对第一维的流出液采样，这样实际上是平均每个 CEC 色谱峰在后面的毛细管电泳中进两次样，也就是说，有 9%的 CEC 流出物进入到毛细管区带电泳分离通道。此二维分离系统用于酪蛋白胰朊酶解产物的分离，13min 分析时间内的峰容量可达 150 个。第二点值得注意的是两种分离方式的正交性。如图 6.3 所示，一些点位于对角线的位置，表明了 CEC 和 CE 的关系。这是因为在第一维中，保留值小的肽类在电渗流的作用下可以在毛细管区带电泳通道内进行分离。Ramsey 等[39,40]用同样原理在玻璃芯片上构建了 MEKC-CE 的二维分离系统，使 19.6cm 长的 MEKC 通道和 1.3cm 毛细管区带电泳通道相偶合，如图 6.4 所示。通过提高毛细管电泳的采样频率，每个 MEKC 的峰可采样 6 次，实现了 15min 内峰容量到 4200 个。第一维采样与第二维分离同时进行，明显地缩短了分析时间，但是这种方法要求精确调节第二维的采样频率，使之与第一维的分离能力相匹配。

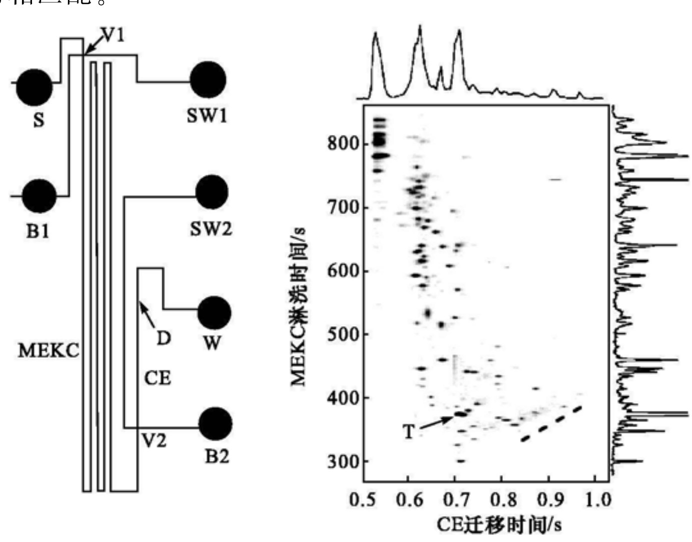


图 6.4　MEKC-CE 二维分离系统

Herr 等[41]在聚丙烯酸微芯片上实现了等电聚焦和毛细管区带电泳的二维分离（IEF-CZE），所提出的方法和 Ramsey 等有些不同。IEF 发生在主通道内，试样在电渗流的驱动下完成聚焦和迁移，而毛细管区带电泳的取样是在与 IEF 垂直的通道中实现的，如图 6.5 所示。Herr 等[42]研究了绿光荧光蛋白、卵清蛋白和糖苷

混合物在二维通道内的分离,并利用荧光成像技术评价了该系统的可行性。结果表明,在 5min 内总的峰容量可达到 1300。但是,此方法在第二维的 CZE 分离中仅对有限的 ICE 流出物进行采样,所以对复杂的混合物,分离时间约为 1h。IEF-CZE 的偶合可使聚焦的峰在第二维分离的时候停流,而且可以对所有聚焦的分析物同时进样,与此相对应的缺点是第一维停流的时间占总分离时间的 3/4。

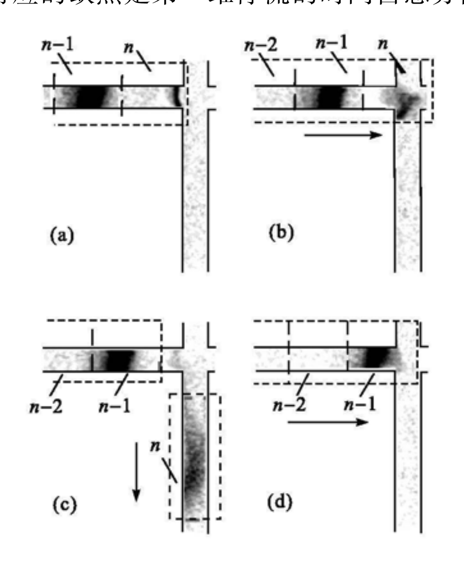


图 6.5　IEF-CE 二维分离塑料芯片构型图

IEF 在水平通道内进行,而 CZE 在垂直通道内进行。(a)聚焦后的组分在 EOF 作用下迁移到 CZE 通道的入口;(b)停止 IEF 通道电压,对 CZE 通道内施加高压;(c)组分通过电泳在 CZE 通道内实现分离;(d)CE 分离结束后,再次对 IEF 通道施加电压,分析物聚焦并通过 IEF 通道和 CE 通道交叉处

在上述的二维分析中,我们需要注意的一点是,上述系统都是用荧光检测方法来评价二维分离系统的性能的。在蛋白质组学研究中,质谱检测方法对肽指纹图谱和蛋白质鉴定是不可或缺的有力工具。不幸的是,目前质谱的采样频率在全扫描模式下,是在每秒 1 个图谱的水平,这就意味着,质谱中分辨一个色谱峰至少需要 3s 的时间,因此微设备如果和质谱联用,其分离效率必然降低,在上述二维分离系统中也就无法实现满意的峰容量。

Slentz 等[43]将胰岛素消解,用铜固定化金属亲和色谱(IMAC)选择性吸附含组氨酸的胰蛋白酶消解的肽,并在同一个 PDMS 微芯片上实现了反相毛细管电色谱。如图 6.6,分析物通过胰岛素消解床,流进 Cu(II)-金属亲和色谱床,随后,含有组氨酸的肽类被 EDTA 洗脱进入反相色谱柱进行分离。

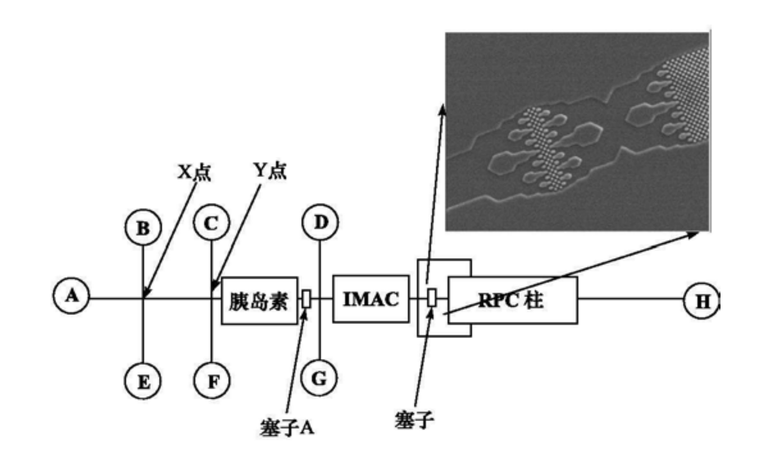


图 6.6　亲和色谱-反相液相色谱二维色谱装置图

A,C,D,E,H:缓冲溶液池;

B:样品池;F:Cu(Ⅱ)-IMAC 吸附剂溶液;G:胰蛋白酶液池

6.2.4　微流控芯片中的多相层流技术及其应用

雷诺把通道内的流体运动分为两种:层流和湍流。其判断依据是雷诺数(Re),表达式如下:

$$Re = \rho v l/\mu \tag{6.1}$$

式中,v、l、ρ、μ 分别为流体流动时的平均速度、特征尺寸、密度和黏度。

$Re<2000$,流体的流动呈层流状态;$Re>4000$,流动为湍流状态;而 Re 在 2000～4000,流动处于一种过渡状态。

通常加工的微通道截面为梯形,可近似为矩形,此时

$$l = 2ab/(a+b) \tag{6.2}$$

式中,a、b 为矩形通道截面的边长[44]。

微流控芯片的通道尺寸一般在 10μm 到数百微米之间。在 10μm 深的通道中,$100\mu m \cdot s^{-1}$ 流速的水的 Re 值约为 10^{-3}。因此,在微米级通道中以较低流速流动的水溶液,其雷诺数通常远小于 1。因此,在微通道内,液流呈纯粹的层流状态,一个通道内可以同时流动几股液流而互不混合,形成多相层流现象。同时,在微流控芯片系统中,区别于宏观体系的另一个特性是显著的扩散效应。粒子在流体中扩散一定的距离所需要的时间可以用下列公式进行计算[45]:

$$t = h^2/D \tag{6.3}$$

式中,h 为扩散距离;D 为粒子的扩散系数。

由于微通道的尺寸在微米级,所以同种粒子在微流控系统中达到与宏观体系中相同程度扩散所需要的时间大为缩短。如图 6.7 所示,传统的免疫分析使用微

滴定板,在溶液中的抗原或抗体的扩散距离为 1.5mm,而微流控芯片中进行的免疫反应微通道内的抗原或抗体的扩散距离仅为 10μm。根据公式(6.3),在微流控芯片体系中,抗原扩散到抗体表面的时间是宏观体系的 1/125 000,这无疑会大大提高免疫分析的速度。

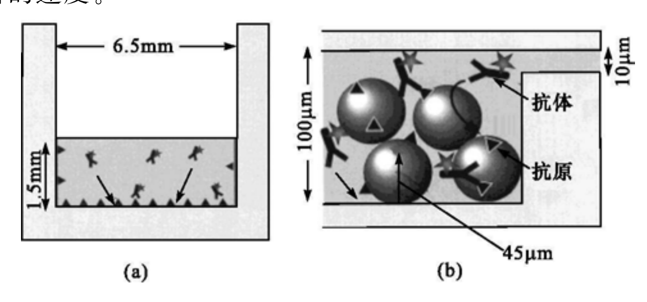


图 6.7 抗原-抗体反应示意图
(a)微滴定板;(b)微芯片[68]

同样,根据公式(6.3),我们可以知道,对于扩散距离相同而扩散系数不同的离子,扩散所需时间差异显著,或者说在相同的扩散时间内,扩散系数相差大的离子,其扩散距离相差也很大。多相层流无膜扩散分离就是利用了微尺度下的层流效应,不同液流在同一通道内流动且互不相混的性质,以及粒径不同粒子的扩散速率的显著差异,实现小分子(离子)和大分子或微粒的分离。

对于含有不溶性微粒的试样,如血液,根据多相层流的扩散作用,微粒大小不同和扩散系数不同等性质,可实现小分子、离子与大分子及较大微粒之间的快速分离。该方法可以代替常规的离心、过滤等操作。

微系统下的多相层流扩散技术在生物样品的分离分析中的应用主要有两种类型:H-过滤(H-filter)和 T-传感器(T-sensor)。其中 H-过滤和 T-传感器的构型如图 6.8 所示。

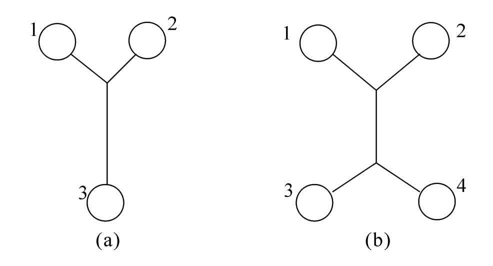


图 6.8 多相层流扩散分离芯片的基本构型
(a)T-传感器芯片;(b)H-过滤芯片
1、2 分别为接受液和试样液的进样口;3、4 分别为接受液和试样液的出液口

利用多相层流技术可以在微流控芯片上实现无膜扩散分离。H-过滤系统由试样流和接受液流组成。在重力或注射泵的推动下，接受液和试样液分别从各自的进样口进入并汇合于主通道，并以层流方式平行通过主通道。由于小分子扩散快，大分子或微粒扩散慢，因此，在一定时间内试样中只有小分子物质可扩散进入接受液，最后可分别在 3、4 流出口处收集接受液和除去提取物后的试样液以供下一步的分析[46]。

Jandik 等[47]采用 H-过滤器微芯片，利用层流扩散分离技术，对血液试样进行预处理，完全避免了生化分析中使用的离心处理，并使样品的处理时间由 30～60min 缩短至 5min，如图 6.9 所示。未经处理的血样和接受液分别由注射泵从两个入口推入 H 过滤器中，形成两相层流。血液中待分析物——环己烯胺头孢菌素和其他小分子质量化合物由于扩散速度快，进入接受液，而血红细胞等大粒子则仍保留在试样流中。在过滤器出口，两相溶液分流，富集了环己烯胺头孢菌素的接受液被收集，用于 HPLC 分离检测，分离后的试样进入废液中。在 T-传感器中，试样和试剂溶液（如酸碱指示剂、荧光标记试剂、抗体等）在重力或注射泵的推动下，从各自的进样口进入，并在主通道形成稳定的两相流，试样中待测组分如 H^+、Na^+ 等小离子快速扩散进入试剂相，并在界面发生反应，利用两相界面间试剂颜色的变化等，可定量测定组分的含量。

Yager 研究组提出的 T 传感器已被用于人血液中的血清白蛋白[48]、血液 pH[49]的测定。图 6.10 为典型的 T 传感器，参比溶液、指示剂溶液、试样液被引入同一个公共通道，形成三相层流流动，可完成基于扩散的自我参比检测。在测定人血清白蛋白时，以一定浓度的血清白蛋白作为参比液，指示剂为白蛋白蓝荧光探针

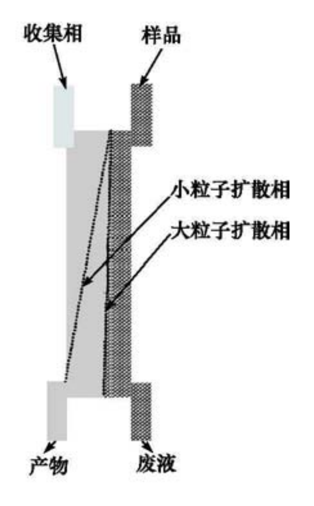


图 6.9　H-过滤器微芯片

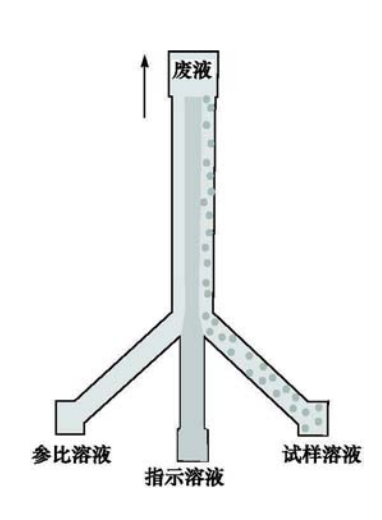


图 6.10　T 形传感器

溶液,在汇合点下游的一定距离处,沿通道截面方向(x 轴方向)用 CCD 测得荧光信号图谱,从中可以得到参比溶液的荧光背景及参比溶液扩散相互作用区的荧光强度、探针溶液的荧光背景、试样溶液扩散相互作用区的荧光强度及试样溶液的荧光背景,可将这些背景进行扣除、参比溶液校正、计算分析物浓度。Schiling 等[49]将 H-过滤系统和 T-传感器有机结合,完成了细胞溶胞、胞内物质提取、分离、检测的集成化分析系统,用于胞内β-半乳糖苷酶的酶法分析。

6.2.5　微流控分析中的渗析分离技术

渗析又称透析,是蛋白质、激素、酶等大分子物质进行浓缩和纯化的常用技术。渗析分离的关键部件是选择性薄膜(或称半透膜),使离子或小分子从半透膜的一侧液相(供体相)转入另一侧液相(受体相)。当膜两侧离子或小分子组分存在浓度梯度时,由于渗透压的差别,离子或小分子组分从膜的高浓度一侧转入另一侧液相中,从而实现组分分离。常规的渗析过程缓慢,需数十小时才可达到渗透压平衡,而且需要的试样用量大,在微量生物试样的处理上较难被应用。

由于微流控芯片具有比表面积大,流体控制方式可采取逆流方式等特点,所以在微流控芯片上进行渗析,具有速度快、效率高、样品用量少等优点。微流控芯片上的渗析设备中的渗析介质可分为 3 种:夹心式膜、渗析管和微渗析探针。

第一类采用商品化的渗析膜,夹在微加工的芯片之间。这种渗析芯片已经用于 DNA 和蛋白质的脱盐,从两性混合物中分离出低分子质量的组分等。Kurita 等[50]用乙酸纤维素膜作为半透膜,采用电化学方法实现了血样中乳酸盐的检测,其装置如图 6.11 所示。

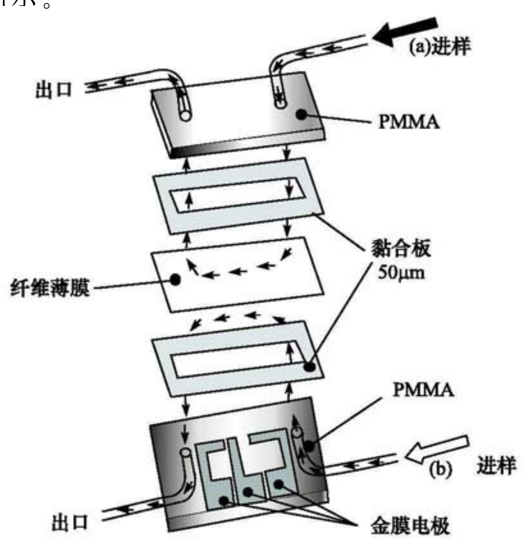


图 6.11　用于分析血样中乳酸盐的微流控芯片渗析装置图

第二种渗析装置是使用一个大的缓冲溶液管、通道或储液池。Severs 等[51]把一个渗析管包围，并通过毛细管将出口连接在分析仪器上，用于在线样品处理。微渗析探针是在药物和生物医药研究中对体内或体外的小分子进行取样的一种常用方法，这种探针通常是和诸如质谱一类的仪器直接联用。如 Sandlin 等[52]利用微渗析探针进行了小白鼠体内的神经递质的采样和检测。

Song 等[53]采用激光成型技术制作了孔径可随通道中溶液性质的变化而变化的具有纳米孔径的渗析膜，并在玻璃芯片通道中嵌入了这种渗析膜，对不同分子质量的物质进行了分离。使用水/甲氧基乙醇作为渗析溶液，高比例的溶液使渗析膜的孔径变小，降低比例则使孔径变大。采用在 5mm 长的微芯片通道内构建渗析膜，膜上层为样品通道，下层为溶液通道，结构如图 6.12 所示。他们使用反相渗析分离研究了不同分子质量物质的渗析分离情况。

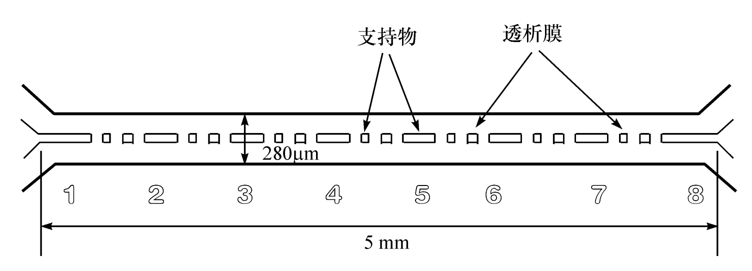


图 6.12　纳米孔作为渗析膜的微流控装置图

6.2.6　微流控芯片中的过滤技术

微流控分析的特点是采用了微米级的通道，在其具有多种优异的特性的同时，也有其不利的一面，如固体微粒的污染物对微通道的堵塞，有时甚至引起整个芯片的报废，所以在微流控分析系统中对液体试样分析前，需引入过滤步骤。实验室中通常使用注射过滤器对溶液进行过滤，需要的溶液体积往往大于芯片储液池加入溶液的体积，这种操作方式不符合微全分析系统的要求。通过微加工的方法制作微流控芯片的过滤器，可应用于试样溶液的预过滤及试样的分离富集等方面。微流控芯片中的过滤器分为轴向过滤器、横向过滤器和三维筛状过滤器。沿通道中溶液流动方向截留的过滤器为轴向过滤器。Wilding 等[54]用标准光刻技术在硅片上加工的围堰形过滤器就是一种轴向过滤器，该过滤器可应用于红细胞和白细胞的分离。He 等[55]加工了一种横向过滤器，将微粒截留在微柱形成的过滤床上，溶液从小柱间的通道网络通过，转向流过分析通道，直径大于 1.5μm 的微粒即被截留。该过滤器可以有效滤除溶液中直径大于 1.5μm 的各种微粒，如细胞灰尘等。

6.2.7　芯片上的免疫分析

免疫分析是利用抗原和抗体的特异性反应进行分析的一种方法，在临床诊断和生化分析中有着广泛应用。但是，常规免疫分析时间较长(通常需要半个小时至数小时甚至十几小时)，需要复杂的仪器设备进行自动操作，而且要消耗较多的昂贵试剂，因此在临床方面的应用受到一定的限制。微流控芯片有体积小、比表面积大等特点，因此基于芯片的免疫分析方法在一定程度上克服了传统免疫分析的缺点，具有反应时间短、分析速度快、试剂和样品用量少、易集成化和自动化等优点，近几年来引起了研究者的广泛关注[56,57]。

通常的免疫分析方法分为均相免疫分析法和非均相免疫分析法。均相免疫分析法中，样品与试剂(通常是标记过的抗原或抗体)混合后，发生亲和反应，反应后抗原-抗体复合物与游离的抗体(或抗原)分离后得到检测。免疫反应可以采用竞争法或直接法进行，前者是指标记的抗原与待测抗原竞争抗体有限的结合位点，而后者是指待测抗原(或抗体)与过量的标记抗体(或抗原)反应。

1. 微流控芯片上的均相免疫分析

微流控芯片上的均相免疫分析多数是由电泳作为分离手段，因为这样的分离方法可以方便地从传统毛细管电泳均相免疫分析移植到芯片电泳；另外一种分离方法则是微流控芯片体系中特有的，即基于扩散作用的分离。

1) 基于毛细管电泳分离的均相免疫反应

在传统的毛细管电泳中进行免疫分析时，为了加速免疫反应，通常将样品和试剂在小试管里进行温育后，再引入到毛细管电泳中进行分离。早在 1993 年，就有利用竞争反应或非竞争反应进行免疫分析的报道，只不过电泳分离不是在微流控芯片上进行[58,59]。1996 年，Koutny 等[60]首次实现芯片毛细管电泳对免疫反应产物的分离，30s 内分离了均相竞争免疫反应后的抗原-抗体复合物和游离的标记抗原以及待测抗原，建立了血液和尿液中氢化可的松的免疫测定方法。这种免疫反应与传统的毛细管电泳免疫分析相似，都是在离线状态下进行免疫反应，并非真正意义上的芯片免疫反应。后来，又用相似的方法实现了血液中甲状腺素[61]和水中的 TNT[62]的分析。

在芯片集成化的研究中，一些研究者进一步将抗原和抗体之间的混合通道也集成到微芯片上，进行在线免疫反应。1998 年，Harrison 等[63]将免疫反应和芯片电泳分离集成在同一微流控芯片上，实现了真正意义上的芯片上的免疫分析，建立了稀血清中茶碱的均相免疫分析方法。后来，他们又在 6 通道微阵列芯片上建立了集成化的抗雌二醇和卵白蛋白的均相免疫分析方法[64]。

免疫分析中另一种常用的方法是酶免疫方法，这种方法是以酶或相关分子（辅酶、酶抑制剂和底物）为标记的免疫反应，并利用酶对底物的催化作用检测抗原和抗体的结合反应进行分析。Wang 等[65]实现了微流控芯片上测定鼠免疫球蛋白(IgG)的均相酶免疫分析法。如图 6.13 所示，IRC 是芯片免疫反应室，在试剂池中加入碱性磷脂酶标记的抗鼠免疫球蛋白抗体（Ab-E），而在试样池中加入鼠免疫球蛋白（Ag）。先在试样池中施加 250V 电压、2s，接着在试样池中加 2kV 电压、3s，则抗原、酶标记抗体分别进入免疫反应室进行混合、反应。电泳分离后，柱后进行免疫反应，底物 4-氨基苯磷酸酯在酶氧化作用下生成 4-氨基苯酚，在分离通道的下游用安培法检测 4-氨基苯酚。在另一方法中，Wang 等[66]直接用氧化还原活性的分子羧酸二茂铁直接标记抗体，通过安培检测法进行检测。

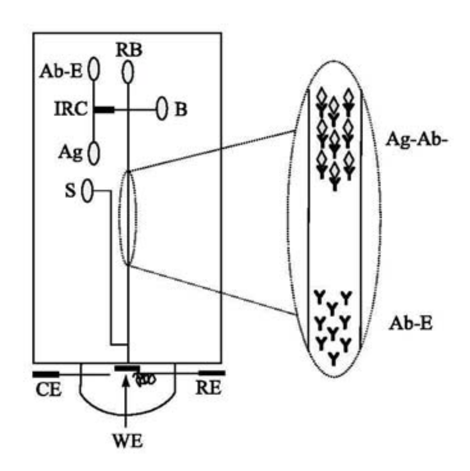


图 6.13　酶免疫分析芯片示意图

RB：缓冲液；Ab-E：酶标抗体；Ag：抗原；S：底物；IRC：免疫反应室；
RE：参比电极；CE：对电极；WE：工作电极

2）基于扩散的微流控芯片免疫分析

得益于微加工技术制作的微流控芯片特殊的尺寸效应，扩散免疫分析法可以在 T-传感器中进行。扩散免疫分析是基于小分子（抗原）的扩散系数比大分子或微珠的扩散系数大得多的事实建立起来的分析方法。在微流控芯片免疫分析的微通道网络中，特殊的扩散效应可使至少包括两个同向的微通道在 T 形交叉处混合，并形成两相层流。两股溶液中分别是抗原（扩散系数大的小分子）溶液和抗体或抗体微珠（扩散系数小），由于抗原扩散速度比抗体快，所以抗原可以在靠近抗体的界面处被抗体捕获，由此形成浓度梯度。这种浓度梯度不但可以进行测量，而且代表了抗原的原始浓度。

2. 芯片上的非均相免疫反应

非均相免疫分析是临床诊断和生化研究中广泛应用的一种技术。非均相免疫反应是将抗原(或抗体)固定在固相载体表面,通过特异性免疫反应,将所需的抗体(或抗原)结合在固相表面以形成抗原-抗体复合物的反应。非均相反应后,通过简单的清洗,即可实现抗原-抗体复合物与游离的抗原、抗体间的物理分离。由于非均相反应可使抗原或抗体从稀溶液中浓缩到固定相表面,具有高效的富集作用,比均相免疫反应的灵敏度更高。但是,常规非均相免疫分析需要较长的温育时间,而且需要很烦琐的液体处理程序(如多次的清洗工作),因此在实际应用中受到一定的限制。而微流控芯片由于体积小,可以使免疫反应速度大大加快,而且一些手工处理可以通过简单的阀切换得以实现,从而提高了其自动化程度。芯片上的免疫分析主要有两种类型:一种是直接利用芯片通道壁作为固相载体,吸附抗原或抗体;另一种是在芯片通道内填充固体微珠作为固定载体,包埋抗原或抗体进行免疫反应。

Eteshola 等[67]在 PDMS 芯片上实现了模型绵羊免疫球蛋白的非均相免疫分析(图 6.14)。首先用牛血清白蛋白吸附在微通道内壁,通入戊二醛活化 PDMS 通道表面,再把蛋白质 A 键合到吸附了 BSA 的微通道内壁,从而使第一抗体特异性键合到蛋白质 A 上。当分析物绵羊免疫球蛋白通过微通道时,被第一抗体捕获,用标记了辣根过氧化酶的第二抗体进行检测,检测限达到 17nmol · L^{-1}。

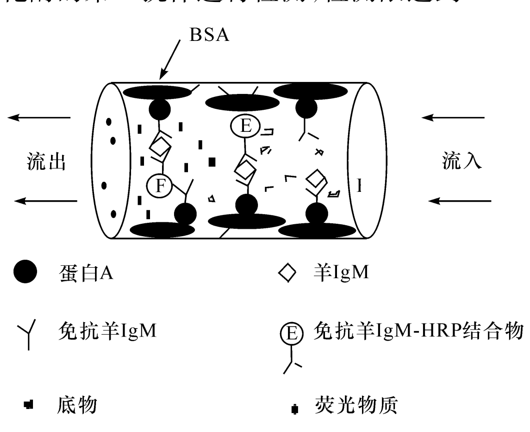


图 6.14 非均相免疫分析示意图

为增加固相载体的表面积,在非均相免疫分析中常采用微珠作为固相载体。Sato 等[68]通过微加工技术在玻璃芯片中加工了用于截拦微珠的围堰,以聚苯乙烯微珠为固相载体,其结构如图 6.15 所示。免疫分析前用注射泵把酪蛋白溶液吸入芯片通道内,对通道内壁进行封闭处理 1h 后,用磷酸盐缓冲溶液取代酪蛋白溶液

对管道进行清洗,再将聚苯乙烯微珠的悬浊液吸入微通道内,微珠便被围堰截获。反应结束后,由激光热透显微镜对吸附在聚苯乙烯小球上的金胶进行检测。实验结束后,可以改变磷酸盐缓冲液的流向,将微珠从微通道内移出,因此这种微流控芯片可以重复使用。Sato 等[68]在这种芯片上采用直接法测定了分泌的人免疫球蛋白 A,常规非均相免疫分析常在滴定板内进行,抗体-抗原反应达到平衡所需要的时间是 10～20h,而在芯片上达到平衡的时间仅为 10min。Sato 解释了芯片上免疫分析速度快的原因,即采用微珠免疫反应,固相载体的比表面积明显增大;扩散距离缩短,溶液中的抗原或抗体扩散至固相载体表面的时间明显缩短。微芯片上的免疫分析,除了分析时间大大缩短外,微珠免疫吸附反应、免疫反应和清洗工作都可由注射泵控制,操作简便。

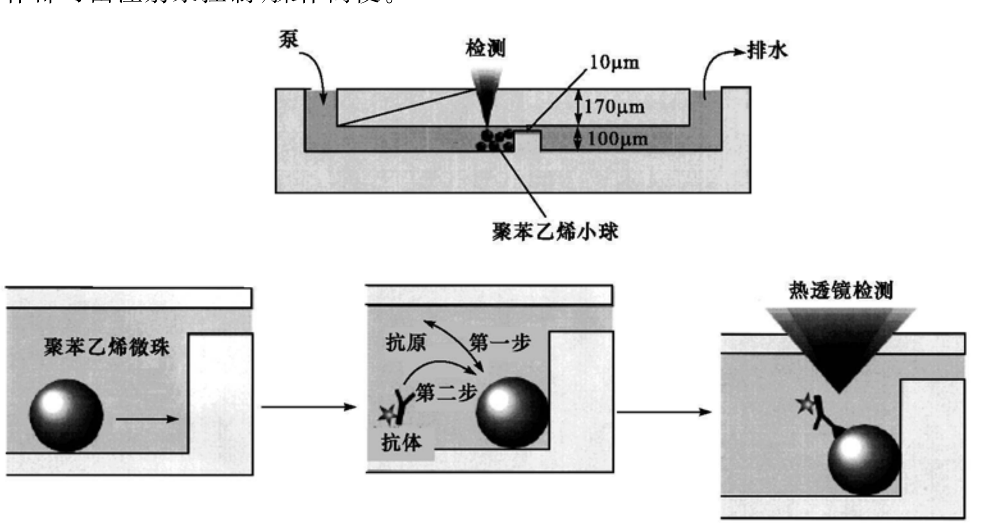


图 6.15　非均相直接法免疫分析示意图

但是这种通过围堰阻挡微珠的方法无疑增加了芯片的加工难度,而 Choi 等[69]采用磁性微珠作为固相载体,进行非均相免疫反应,无需在通道中加拦截微珠的围堰,在电场作用下,能很方便的将微珠引入,并附着于通道表面进行免疫分析,反应结束后撤去磁场,释放磁珠进入检测器或被排出,因此芯片的加工更为简单,操作更为方便。

Lai 等[70]建立了具有 24 组检验功能的 CD 光盘式 PMMA 酶链免疫分析(enzyme-linked Immunosorbent Assay,ELISA)微流控芯片平台(图 6.16)。该微流控芯片系统集成了一系列微流体控制功能,包括毛细阀、离心泵等顺序流控制装置,通过 CD 盘转动所产生的离心力驱动液流。该设备中,将抗体固定在储液池中,借助离心力和表面张力可控制试剂在储液池间的顺序流动;控制 CD 光盘的旋转速度可以实现 ELISA 过程中每一步操作的自动完成。该系统同常规 96 孔板相

比,检测范围相同,但试剂消耗大大减少,仅需 30μl,是常规法(300μl)的 1/10,且检验时间缩短到 1h 之内。

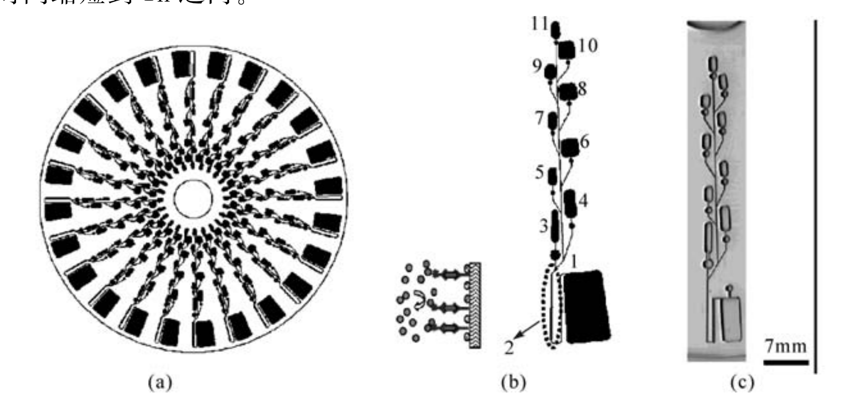


图 6.16　具有 24 组检验功能的 CD 塑料光盘式酶联免疫分析微流控芯片系统
(a)24 阵列酶联免疫分析装置示意图;(b)单个酶联免疫分析单元;
(c)单个酶联免疫分析单元光学照片图

Arenkov 等[71]利用了凝胶的比表面积大、稳定、荧光背景低、非特异性吸附少、容量高等优点,在非均相芯片免疫分析中,将抗体固定在聚丙烯酰胺凝胶上,在直径为 12.7cm 的芯片上加工了 676 个凝胶微反应室阵列,采用直接免疫法或夹心免疫法进行了昆布氨酸、纤维结合蛋白、甲胎蛋白、C 反应蛋白和人免疫球蛋白的同时检测。除了使用微通道壁、微珠,还可以使用凝胶和等离子聚合膜作为固相载体。

6.2.8　芯片上的聚合酶链反应

Mullis 等[72]建立的聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)是一种对核酸分子进行体外扩增的方法,由于其前所未有的灵敏度和特异性,受到人们高度重视,已成为基因研究的关键技术,广泛应用于生物科学的各个领域,也是最重要的 DNA 样品处理技术。PCR 技术的出现是现代生物工程技术一个划时代的进步,它同时也大大促进了现代生物学的发展。反应的主要操作过程在 3 个温度区间重复循环,经过酶促反应扩增特定的 DNA 片段。传统的 PCR 检验技术一般包括 3～4 个步骤:第一步,从样品中提取目的核酸;第二步,进行 PCR 扩增;第三步,通过琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色确定扩增产物大小;第四步,目标产物的鉴定。目前,第三步通常省略,产物的特异性是通过劳动强度很大的固相探针杂交确定,如 Southern 杂交分析法。尽管科学家们对 PCR 技术进行了一系列改进,发展出新的技术,如 PCR-ELISA 等,简化了分析步骤,但总的来说,传统 PCR 检验的 4 个步骤至少需要 2～3 天完成,而且大部分检验操作需要手工完成,所以常规的 PCR

检测主要用于高度专业化的实验室研究，不适用于商业性的检验鉴定。

常规的 PCR 方法存在着耗时长、操作烦琐、试剂消耗量大等缺点，寻求更快速、更简便的方法一直是人们追求的目标。微流控芯片为 PCR 微型化操作提供了一条可行的途径。与通常的 PCR 设备相比，微型化的好处是显著改善了热能传输，极大地提高了热循环速度，降低了昂贵试剂的消耗，使系统具有灵活、多功能、集成化的特点，但微系统下较大的比表面积会产生与表面吸附有关的不利影响。为克服这种不利影响，人们研究了各种表面处理方法，对芯片材料进行表面涂层或钝化。

PCR 通常需要在一定的循环变温条件下完成，根据循环变温方式不同可分为微室静态 PCR 微反应器和连续流动式 PCR 微反应器。

1）微室静态 PCR 微反应器

微室静态 PCR 微反应器是通过循环变温的方法实现的，反应混合物在反应室内静止不动，而反应室内的温度随时间循环变化。此类 PCR 反应器的加热、冷却变温速率是影响扩增效率的关键。加热源有外部加热部件、非接触型红外线和直接加工在微流控芯片背面的电阻加热器（如钨或铂膜），而冷却是通过风扇或帕尔贴（peltier）半导体加热器完成的，PCR 扩散完成后，即可将产物取出或在线检测。

1993 年 Northrup 等[73]在硅微结构中首次实现了微室静态 PCR 实验。他们利用微加工技术在硅片上制成一个入口和出口以及几微升反应室的微结构，该装置用耐热玻璃片经阳极键合法封接而成，加热器集成在芯片中，与传统的 PCR 相比，在同样的扩增效率下，该方法热循环速率快 2～10 倍。此后，许多研究者开展了微室静态 PCR 微反应器芯片研究工作，对从 PCR 微反应器加工材料及表面改性、加热方式及变温速率，到采样、分离、检测等操作的集成化进行了广泛的研究。目前，PCR 芯片的基片多采用硅、玻璃，由于硅导热性能好，而且是各向异性腐蚀，蚀刻程度容易控制。但由于硅的光学和电学性能较差，难以与毛细管电泳分离系统相匹配，也不能直接进行光学检测，在集成化上受到限制。玻璃具有透明、荧光背景低、不导电、价廉、加工简单、易封接等优点，是目前常用的微流控芯片基片。但作为 PCR 芯片的基材，玻璃导热系数小，导热慢，因此可采用硅-玻璃两种材料作为 PCR 所用的芯片材料。通常 PCR 扩增前需要对微反应器通道进行表面改性，以得到较好的扩增效果。Giordano 等[74]对在玻璃基质上的 PCR 芯片进行硅烷化处理，使其表面形成钝化层，将环氧（聚）甲基丙烯酰胺吸附在玻璃表面，用聚乙烯乙二酸、聚乙烯吡咯烷酮、羟基纤维素等作为动态涂渍的添加剂，并研究了这些添加剂的表面相互作用。通过对不同条件下的 PCR 产物分析表明，这些涂层能充分钝化芯片表面。

同其他芯片上的生化分析技术相似，芯片上 PCR 反应可以通过将设计的微流

控元件进行组合，在 PCR 之前完成组织、细胞、全血、土壤、食品等各种样品中 DNA 的提取，然后在芯片上进行扩增，扩增后的产物用电泳进行分离分析。Khandurina 等[75]将在线局部加热 PCR 和预富集元件集成在一个微芯片上，并将 PCR 反应产物用电泳分离，实现了 DNA 的快速测定。DNA 进样之前先要通过一个多孔膜结构进行富集。如图 6.17 所示，采用双帕尔贴元件作为加热制冷源，可以减少循环次数来降低反应时间，使整个分析时间缩短到 20min 之内。2002 年同一研究组[76,77]提出集成化的整体柱如图 6.18 所示，该整体柱包含了几个刻蚀在玻璃芯片上的 280nl PCR 反应室，并通过微阀和疏水性的进液孔引入样品，芯片背面集成有薄膜加热器和 T 形热电偶。由于被加热的体积很小，又使用了薄膜加热器，10min 完成 20 次循环扩增，扩增后的产物直接注入填充有筛分介质的微通道，经分离后进行激光诱导荧光检测，灵敏度高，可检测 20 拷贝，μl^{-1}样品，可用于单分子的 PCR 扩增。

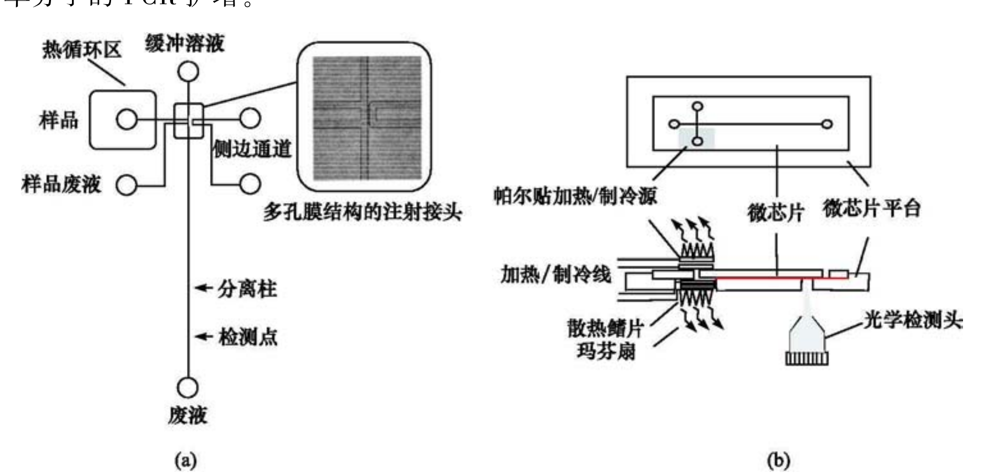


图 6.17　集成有加热装置的 PCR-CE 微芯片

(a)集成化快速 PCR 分析芯片构型图；(b)双帕尔贴热循环系统结构示意图

集成了采样、分离、检测等功能的 PCR 微反应器芯片使 DNA 检测速度大大提高，是芯片上 PCR 扩增的重要发展方向。将 PCR 扩增和电泳分离集成在同一芯片上的方法已有报道。这些装置一般都包括进行热循环的微反应池，微反应池与微通道网络连接，完成注射、分离、检测等步骤。

Waters 等[78]设计了集成式细胞溶胞-PCR 扩增-电泳分离芯片，该芯片可同时进行多个试样的 PCR 扩增-电泳分离。利用该芯片可同时进行 4 个试样细胞溶胞-PCR 扩增-CE 分离检测。该小组采用标准的 PCR 方法同时对 199bp、500bp 的 λDNA 和 346bp 大肠杆菌 DNA、410bp 质粒 DNA 进行扩增分析，可以测定未知的扩增产物片段的长度。

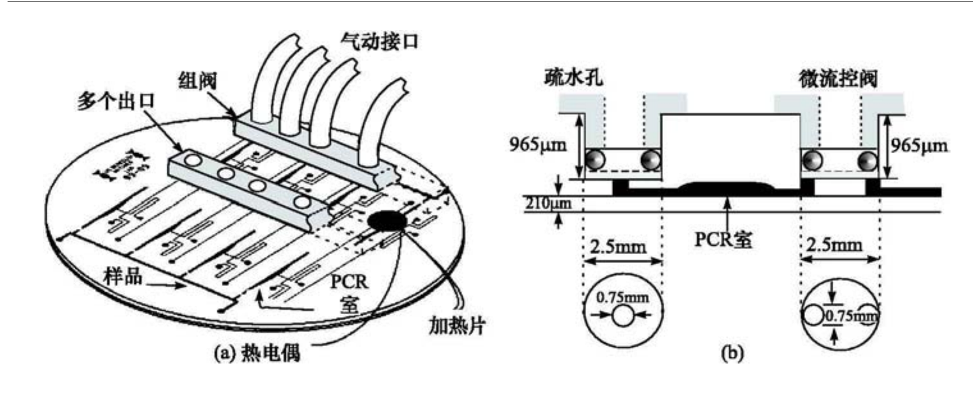


图 6.18 (a)PCR-CE 装置示意图;(b)疏水孔和微流控阀示意图

由于高聚物芯片具有价廉、易于批量生产的特点,在 PCR 反应器的应用上也得到研究者的关注。Oda 等[79]在 PDMS-玻璃杂交芯片上,利用卤素灯发出的红外线加热和压缩空气冷却系统,成功地进行了 PCR 扩增,并实现了在线分离检测。

Giordano 等[80]在聚酰亚胺微流控芯片上加工了 1.7μl 的 PCR 反应室,并采用非接触红外线作为加热源,自然冷却降温,在 240s 内实现了 500bp 的 λDNA 的 15 次扩增。Yang 等[81]报道了在聚碳酸酯(PC)芯片上设计出了蜿蜒形通道微室静态 PCR 反应器,以两块帕尔贴元件作为加热与制冷源,PC 芯片放在两块加热元件之间,通过大肠杆菌 K12 细菌细胞 K12 基因扩增,证实了 PC 芯片 PCR 微反应器扩增的快速性、有效性、检测的高灵敏度和序列的特异性。

Obeid 等[82]将反转录-PCR(RT-PCR)集成在一个可重复利用的玻璃芯片上,以连续流模式实现了扩增循环的选择。Marcus 等[83]在微流控芯片上实现了高通量的 RT-PCR 扩增,他们采用 450pl 的微反应室,实现了 30 拷贝的 RNA 模板的检测。他们还采用多层软光刻技术,制作了三层 PDMS 构成的芯片,并将其固定在玻璃盖片上。芯片结构如图 6.19 所示。

2) 芯片上连续流动式 PCR 反应

连续流动式 PCR 微反应器中,温度在空间维度上变化。反应混合物溶液流过 3 个不同温度区的反应通道,经历变性、复性和延伸,完成扩增过程,扩增产物可以离线或在线检测。PCR 的扩增效率取决于反应混合物溶液在某一温区微通道的停流时间,即该区的微通道的长度、截面积及混合物溶液的流速。微通道比表面积大,使得反应时间短,且温度在空间维度上变化,不存在静态微反应室中面临的升温降温对速率影响的问题。

连续流式 PCR 反应器目前有逶迤形、螺旋形和环形三种基本结构。1998 年,Kopp 等[84]首次报道了玻璃芯片上的逶迤形连续流式 PCR,其基本构型如图 6.20 所示。

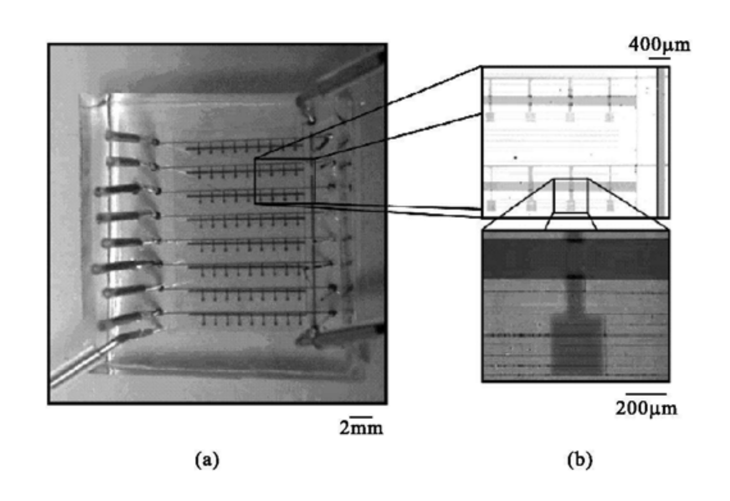


图 6.19　RT-PCR 装置图

(a)装有食用染料装置的光学照片;(b)反应室的光学照片。右上方是八个反应室,右下方是一个反应室的放大图像

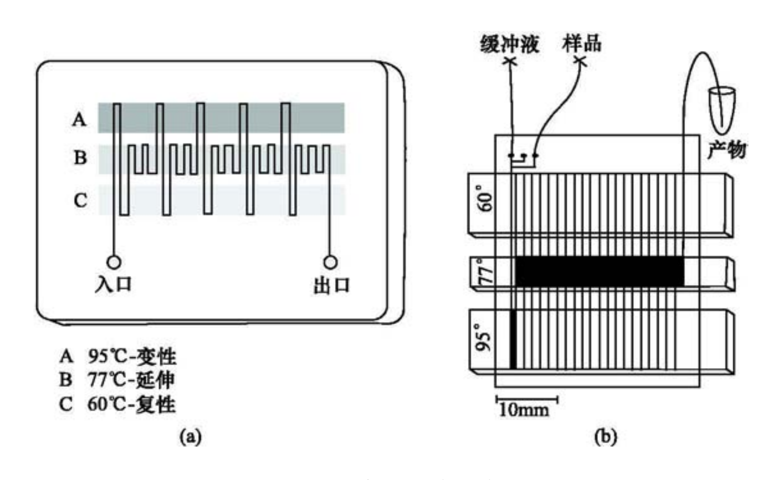


图 6.20　透迤形连续流式 PCR

采用三温区反应方式,在一透迤形长通道内不同区域形成 3 个不同温度的反应区,PCR 反应物顺序流过这些温度带,可连续进行变性(95℃)、复性(60℃)、延伸(77℃)反应,完成扩增。为了使 DNA 解链完全,可增长第一次循环变性通道,延长变性时间。在 5.8nl · s^{-1} 的流速下,18.7min 内进行了 20 次 PCR 循环,扩增了 176bp λDNA。Chou 等[85]在低温陶瓷上加工了连续流式 PCR 反应器,在透迤形通道内形成了不同的温度反应区,实现了不同的保留时间、不同温区的反应通道截面积不同;同时,在微芯片上各微区之间充有空气隔热带,防止各温区间的热扩散;采用 Ag/Pd 薄膜作为加热元件,在 15μl · min^{-1} 的流速下,40min 内实现了 30

次 PCR 循环。

刘金华等[86]比较了云母片、石棉、泡沫塑料等隔温材料对逶迤形连续流式芯片 PCR 性能的影响，结果表明云母片的隔热效果最好，成功地扩增了浓度为 10^{-2}ng·μl^{-1} 的 500bp 的 DNA。同时，他们将芯片分为延伸、变性和复性 3 个温区，由 3 个弧形加热块分别控制温度为 72℃、95℃和 55℃，扩增循环时间由内向外逐渐增加，在 26min 内成功扩增了质量浓度仅为 10ng·ml^{-1} 的 6012bp λDNA[87]。通过将小孔径石英毛细管作为顺序注射(SI)系统的连接管路，使体系死体积降到 0.30μl，实现了微升级样品的自动换样、连续 PCR 扩增和微通道洗涤等功能，样品间无交叉污染，每小时可扩增 7 个 500bp 的 λDNA 试样。Soper[88]、Sun 等[89]在透明的石英玻璃上实现了连续流 PCR 扩增，热源采用铟-锡氧化物薄膜。

3）环形 PCR 微反应器

Liu 等[90]在硅橡胶-玻璃复合微流控芯片上加工了环形 PCR 微反应室，仅需 12nl 样品。通过在控制通道加气压使液体通道封闭，起到微阀的作用，选择性地开关微阀可使液体封闭在环形通道内，并借助于蠕动泵控制液体流动。荧光显微镜聚焦在无加热器覆盖的液体通道处，用于实时检测 PCR 扩增结果。环形的 PCR 微反应室既能进行连续流动式 PCR 扩增，又能进行微室静态 PCR 扩增。进行连续流动式 PCR 扩增时，样品混合溶液进入微反应室后，在出、入口处控制通道关闭出、入口阀，然后启动蠕动泵，使样品混合溶液在环形通道内不同温区循环流动，样品混合溶液在不同温区的停流时间由通道宽度或热源长度来调整。对于 3 步 PCR 扩增 λDNA，可在 40min 内实现扩增。环形 PCR 微反应器具有样品消耗少、损失小、不被稀释等优点。

6.2.9　微流控芯片上的细胞分析

微流控芯片所具有的一些重要特征使其特别适合细胞分析。因其二维或三维结构网络通道及微通道的尺寸与单个细胞的尺度相似，因而可以实现对单个细胞操控，并可以使分离检测系统集成在一起。目前，微流控芯片上的细胞分析已涉及细胞的培养、细胞计数和分类筛选、胞内成分分析、分子离子和细胞的相互作用及单细胞分析等方面的研究。

1. 细胞计数和分类筛选

细胞的计数和筛选是生物学和临床医学不可缺少的一门技术。传统的荧光标记细胞分拣器已经被广泛地应用于细胞筛选，但有设备昂贵、消毒困难、并且样品用量多等缺点。其次，细胞分拣过程中所需的高压电场使细胞的成活率低，这也是传统荧光标记细胞分拣的一个缺点。微流控芯片上的细胞计数和筛选方法中有以

下几种方法控制细胞的流动或移动。微流控芯片上的细胞计数通常是采用电渗泵或电泳泵驱动细胞在微通道网络里迁移[91~94]，如图 6.21 所示。

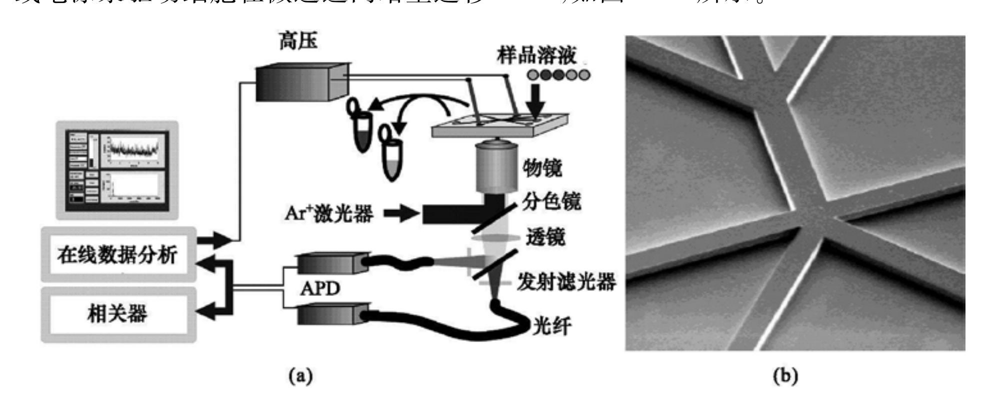


图 6.21　(a)集成化的细胞分拣、检测微流控芯片；(b)细胞分拣芯片所使用的硅模板的 SEM 图[94]

用电渗流或电泳进行细胞筛选时，在高电场的作用下，细胞的成活率比较低。因此研究者开始采用液压控制的流体阀实现芯片上的活细胞筛选，这种流体驱动方式虽然可以提高细胞的存活率，但通量低[95~97]。

最近研究者们又提出利用三维光栅作为光学开关进行细胞筛选[98]。Wang 等[99]也使用光学开关对流过微通道的细胞进行了筛选。这种基于光学开关的细胞筛选装置，既提高了分析速度，也提高了细胞的成活率，但是却稀释了样品。

Shirasaki 等[100]提出了一种新型的基于荧光检测的芯片细胞分拣方法。这种方法使用热可逆的凝胶聚合物作为转化阀的开关，实现了埃希氏菌属细胞的高通量、快速筛选，并且细胞不受到损害。他们采用传统的湿法蚀刻方法，在玻璃上刻蚀出 Y 形微通道，有一个入口和两个出口，两个出口分别为收集池和废液池。检测器置于 Y 形通道连接处的上游，而红外激光光源可以自动移动位置，如图 6.22 所示。将荧光标记的细胞与热可逆凝胶的混合液通过注射泵从入口处注入微通道，进入 Y 形通道。当非荧光物质通过检测器的时候，红外激光光束在收集池段微通道的上方，使凝胶受热凝固，堵住流体通往收集池的一方，而使流体进入废液池；而当荧光标记的细胞通过检测器时，将红外激光光束定位到连接废液池端的管道，处于红外激光照射的通道部分中的热可逆凝胶固化，阻挡了细胞通往废液池的通路，而使它们向收集池移动，从而实现了细胞的筛选。

流式细胞计数是一种快速分析、筛选细胞的技术[101]。很多文献[102~105]详细报道了微流控芯片上的流式细胞计数器技术。荧光标记和光散射法是流式细胞计数的一种常用技术，是将待测细胞制备成稀释的细胞悬液，经特异性荧光染料标记后，使细胞排成单列在微通道内通过，用激光照射流过的单细胞，将其瞬间产生的

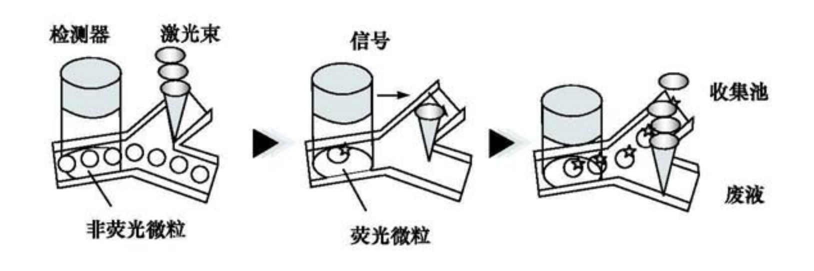


图 6.22　利用热可逆凝胶高聚物控制流体流动进行细胞分拣原理示意图

散射光和荧光转换为电信号,并通过计算机进行处理和综合分析,进行细胞计数和分类。Ramsey 等[106]报道了在玻璃微流控芯片上使用荧光标记的流式细胞技术。他们使用十字通道玻璃微流控芯片,用不同的荧光染料标记以区分不同的细胞,电泳分离,激光散射和荧光双重检测,可从大量细胞中分离出癌细胞并进行早期诊断。McClain 等[107]在微芯片储液槽施加电压,利用电泳力转移细胞,并将细胞聚焦于通道交叉处,利用光散射和荧光实现单细胞计数。

Fu 等[108]在玻璃芯片上制作电动驱动的流式细胞计数器,并用光纤对细胞进行在线检测。该装置包括以下几个模块:电动聚焦设备、内置的控制电极、埋在芯片里的用于在线检测的光纤、用于生物粒子收集的电动开关。所用的装置如图 6.23 所示。

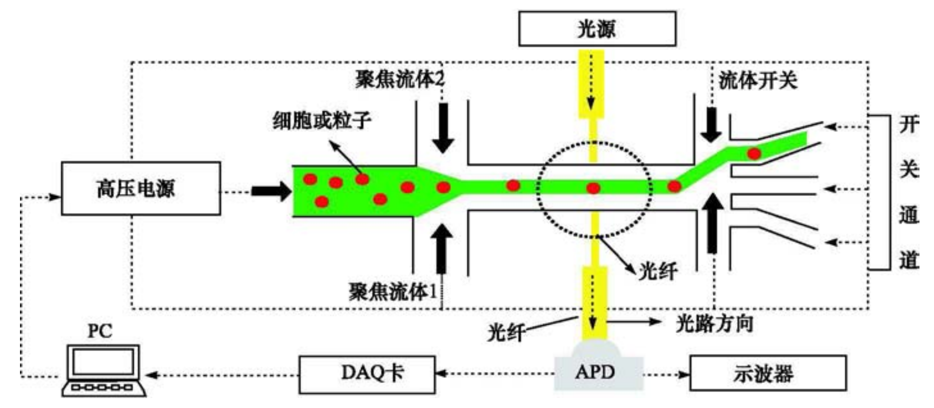


图 6.23　电动驱动流式细胞计数器装置图

库尔特细胞计数器是一种常用的细胞计数器。Larsen 等[109]推出了微芯片上的库尔特细胞计数技术。该装置由单晶硅和玻璃盖片组成,在硅片上刻蚀出直径为 32～100μm、深度为 30～70μm 的小孔,并形成 5 个并行的分离通道。中间 3 股液流为电解质液,产生流式细胞仪中常规的鞘流,而另外两股液流为非导电介质,具有动态调节鞘流有效宽度的能力。因为只有中间的 3 股液流可以导电,因此这 3 股液流的宽度决定了电导检测的灵敏度。鞘流出口处的电极用来检测电阻的变化。该方法

制成的仪器成功地监测了牛奶中体细胞的数量和大小，用于监测牛奶质量。

Gawad 等[110]利用微加工技术制作了细胞阻抗分析仪，并成功地对细胞进行了计数、筛选及细胞种群的研究，筛选频率可达每分钟 100 个样品。Voldman 等[111]建立了基于介电泳的阵列细胞计数器芯片，可以对细胞进行捕获、保留以及选择性释放生物粒子。

Morishima 等[112]提出了一种新型高通量的微生物筛选方法。该方法利用介电泳力和激光镊子在微通道内对大肠杆菌进行无接触的传输和操纵。激光镊子用以将单个大肠杆菌捕获在电场中央。不同的微生物受到周围电场的极化作用不同，导致微生物（细胞）向不同方向迁移，从而实现不同微生物及细胞的区分。

2. 胞内成分分析

对细胞内化学成分的分析有助于加深对不同细胞内化学组分的差异、生物活性以及外界刺激引起的细胞成分的变化等的理解。而对于临床诊断来说，如何通过细胞内组分的变化来区分健康细胞和受感染的细胞具有重要意义。

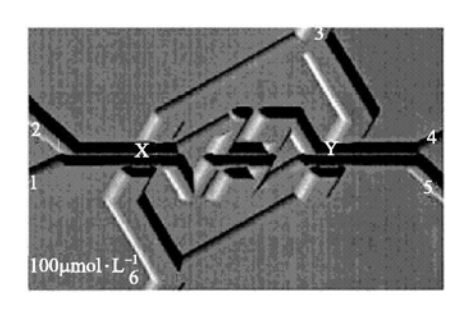
胞内成分分析包括细胞内的核酸分析、类脂质（如线粒体）分析和其他小分子化合物的分析。胞内物质的检测基础为细胞膜的消解，常规的细胞膜消解方法是化学消解和超声消解。McClain 等[113]在芯片上实现了电消解和化学消解。首先，利用可以透入细胞膜的荧光探针标记白血病细胞，接着在具有十字通道的玻璃电泳芯片的微通道内消解此类细胞。化学消解可在 1s 内完成，而电消解速度更快。

Schilling 等[114]利用微通道内的层流效应，将一个层流 H 形过滤通道和一个层流 T 形检测通道组合，构成包括细胞消解、杂质分离、β-半乳糖苷酶的酶法测定等一系列功能的集成化多层聚酯微芯片。芯片由激光烧蚀法加工而成，微通道宽 1000μm、深 100μm、长 4cm。首先大肠杆菌细胞和其消解试剂在 H 形通道会合，细胞膜在线消解后，分离除去大分子干扰成分，含细胞成分的 β-半乳糖苷酶的溶液进入与之相邻的 T 形通道，与带荧光的底物汇流后，发生酶解反应，产生异噁唑，进行荧光检测。

Waters 等[115]将大肠杆菌细胞在线消解后的 DNA 和质粒 DNA 经 25 次热循环 PCR 扩增后，以芯片毛细管电泳进行分离检测。

3. 单细胞分析

Yang 等[116]在石英玻璃上刻蚀微通道，并以 PDMS 作为盖片构成单细胞分析芯片。如图 6.24 所示，该装置以液压为驱动力，用通道中心的坝拦截钙荧光染料 FLUO3-AM 标记的细胞，当通道 5 中的液流压力大于通道 4 时，则部分液流越过坝到达通道 4，导致通道 5 中的细胞沿坝停留。待细胞完全固定在坝上，减少流过坝的液流，由于流速减慢，多余的细胞不能越过坝，而被通道 5 中的主液流沿通道



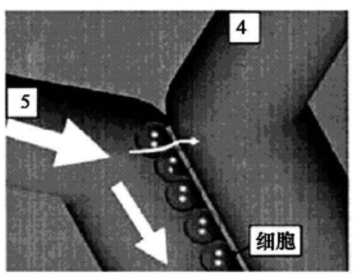


图 6.24　微流控芯片构型图和单细胞层形成

方向携带出去，在坝上形成一层固定的单细胞。当具有梯度浓度的三磷酸腺苷(ATP)溶液流过贴壁细胞，引起细胞内钙离子浓度的变化时，用共焦激光扫描显微镜可以检测荧光信号的变化。

Irimia 等[117]在微流控芯片上皮升级的封闭体积内，实现了淋巴细胞的在线化学消解，并对胞内水溶性的染料和不溶性的肌动蛋白进行了定量分析。

Marcus 等[118]在微流控芯片上实现了单细胞基因表达分析。他们利用多层软光刻技术加工的 3 层 PDMS 与玻璃层键合在一起形成芯片结构，并在该芯片上实现了单个细胞的 mRNA 的分离和 cDNA 的合成，并提供了分离和合成过程中的定量校正关系，测定了单细胞的基因表达。该器件可以同时测定 4 个样品，且其通量还可以进一步提高。

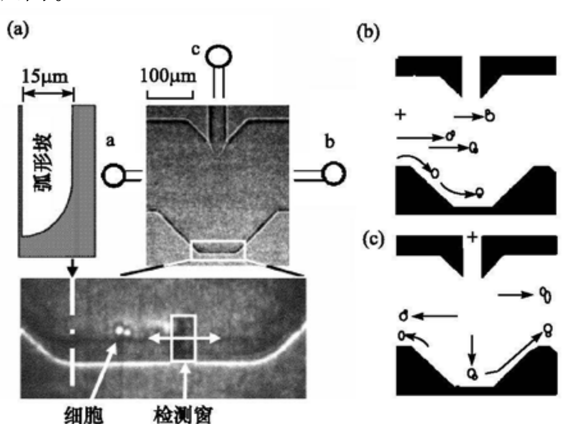


图 6.25　芯片构型和细胞选择原理

(a)保留细胞的微结构：包括一个引入细胞的宽通道(孔 a 或孔 b)和一个输送缓冲溶液或试剂的窄通道(孔 c)，宽度为 40μm，管道的深度均为 15μm。微结构位于试剂通道的对面，包括一个中间平坦的 V 形栅栏。荧光信号在检测窗处由光电倍增管检测(见下方的放大图)。酵母细胞芽体实际上是在液流的平衡下自由的躺在半径为 15μm 的弧形坡上(见插图左上)。(b)细胞引入：左边的液流载带着一组细胞到达微结构处。(c)细胞选择：c 处的液流将细胞分离并把需要的细胞沉降到检测窗处。液流可以通过流体压力(<1mm)或电位差进行驱动(0.01～1.5kV)。“+”表示高势能处

一个理想的进行单细胞实验的微芯片应该可以实现细胞的培养、选择、保留(为实现检测),并且随时可以将缓冲液或试剂输送到细胞。更为重要的是,在对细胞进行操作时,应尽量减少对细胞的负面影响。为此,Peng 等[119]提出了三维液流控制的概念,利用特殊的流体场在芯片上自由的操纵和保留酵母细胞,如图 6.25 所示,通过控制零速度点,确定细胞在微通道内的位置以实现细胞平衡扫描。因细胞上所承受的仅仅是重力作用,而这个力也能够在弧形的通道壁上得到平衡,因此可使强大液流对细胞的负面影响降到最低。他们在此芯片上实现了单个细胞的培养、除去细胞壁、试剂输送等功能。

6.2.10 微流控芯片-质谱联用技术

生物质谱(Bio-MS)作为生物分析化学的重要组成技术能够提供试样中生物大分子的基本结构和定量信息。20 世纪 80 年代末两项软电离技术即电喷雾离子化和基质辅助激光解析离子化的发展,可以使生物大分子在特定条件下电离时仍然可保持分子间的非共价相互作用,这对生物分子的组成和功能分析极为重要,因此质谱是蛋白质和多肽等生物分子的研究中不可缺少的工具[120]。

Ramsey 等[121]率先开展了芯片-质谱联用技术的研究工作,证实了微流控芯片与质谱可产生相辅相成的效果。微流控芯片上比较容易实现溶液的前处理,如固相萃取、酶解、预富集、分离等,和 MS 对样品纯度高的要求相适应,而质谱的高灵敏度和高通量检测也与微流控芯片样品量少及总体目标相匹配,两者联用可满足基因组学和蛋白质组学等生物分析的需要。微流控芯片与质谱联用最重要的部分是接口,它是整个联用装置成败的关键,下面主要介绍微流控芯片和微流控芯片-MALDI-MS 接口。

1. 微流控芯片-ESI-MS 接口

ESI-MS 在过去十几年的迅猛发展主要归功于其进样方式与高效分离技术,如 HPLC 和 CE 等技术的方便联用。但是这种 ESI 技术试样消耗近毫升级,与微升级的实际生物样品的体积不匹配。微电喷雾(μ-ESI)技术的试样消耗量在 $\mu l \cdot min^{-1}$左右,喷针的出口内径一般在 10~15μm 之间。与微分离系统联用,分析生物大分子最为常用的离子化方式是电喷雾离子化[122]。这种联用系统的核心部件就是喷口,喷口输送样品液进行离子化。在喷口和质谱仪之间需要一个强电场,用于样品的离子化并把产生的离子输送到质谱仪。喷口最重要的性质是低流速并且尖锐。流速低可以实现高的离子化效率,而尖锐的喷口则可以产生高电场。20 世纪中期,提出了纳喷雾的概念(n-ESI)[123],纳喷雾的喷口内径一般在 5μm 以下,溶液消耗量可降至几十至十几 $nl \cdot min^{-1}$,这在蛋白质组学研究中显示了优越的性能。

微流控芯片-质谱联用系统的接口需要提供微、纳升级溶液在高压电场下形成泰勒锥，完成电喷雾离子化。目前，芯片-ESI-MS 的接口按结构可分为出口直接喷雾型、外接喷雾毛细管和尖锥出口喷雾型。

1）出口直接喷雾

这种结构是最早实现的微流控-MS 联用的电喷雾模式[124]，直接使用微流控芯片分离出口作为接口，由出口流出的待测物溶液在电场作用下直接被喷雾离子化。该接口制作简单，适合用于连续流试样，但由于水及常用的溶剂对玻璃的浸润性好，使得试样流易在芯片的出口端平面铺展，液滴体积超过 12nl，从而引起组分的稀释和区带展宽。

为解决上述问题，可以对微通道出口进行处理或改用疏水性高聚物作为芯片材料来降低分离通道出口处的润湿性能，从而降低液滴大小，提高检测的灵敏度。Xue 等[125]对微通道出口进行硅烷化处理降低了喷口处的润湿性能；而 Rohner 等[126]则直接使用 PET 作为芯片材料，利用该材料的憎水性防止了液滴在芯片端面的铺展，使直接喷雾式 MS 质谱分析马肌红蛋白的检测限达到皮摩尔级。另一种降低液滴体积的方法是使用辅助气流来加速溶液气化。在芯片上另制作一通道与喷雾口联接，内通辅助气，出口溶液在气体辅助下，在没有形成大液滴之前即可气化喷雾，从而保证了芯片的高分离效率，理论塔板数可达 $7\times10^4\ m^{-1}$。由于直接喷雾法难以有效地降低喷雾溶液量，且重现性差，因此它已经被尖锥出口喷雾的接口代替。

2）外接喷雾毛细管

针对直接喷雾接口难以克服的局限，研究者提出在芯片出口处外接一段毛细管以实现电喷雾，此时的接口实际和标准的毛细管电泳-MS 接口模式相似，故可将毛细管电泳-MS 联用的研究成果直接用于芯片系统，便可取得良好的喷雾效果。微流控芯片上外接喷雾毛细管系统采用标准雾化器的同轴鞘流结构[127]或较简单的液接界形式[128]，但这两种方式的共同缺点是稀释了待测物，延长了分离时间，使分辨率和灵敏度下降。

将一小段毛细管喷口拉细至直径在 10μm 以下，连接在芯片上，就可以省掉辅流或液接的部件，简化系统结构和复杂性。更细的喷口还可以形成更小的喷雾滴，从而进一步提高检测系统的灵敏度和分辨率。由于没有金属鞘流外套管或液接面，因此可以施加 ESI 高压，一般要采用在金属管喷口镀金属（金、银）或导电高分子层，或在喷雾毛细管末端插入电极丝的方法制作 ESI 电极。这种制作电极的方法简单，但镀层的强度有待提高。而直接使用电阻丝会产生气泡问题。为解决这些问题，可将外接毛细管分割成毛细管和喷针毛细管两段，用金属丝连接两通管，

使该两通管同时可作为 ESI 电极[129]。Lazar 等[130]则将毛细管与通道连接部分腐蚀成多孔玻璃薄膜和一 U 形通道实现溶液隔离，在 U 形通道内添加缓冲溶液并加入 ESI 高压电极，电压可通过该玻璃膜传导，在 20μm 内径的毛细管出口实现 ESI。

高聚物材料芯片的易加工性为实现更简单可靠的电喷雾质谱的接口提供了条件。Lazar 等[131]在聚碳酸酯高聚物芯片通道一侧加工了螺纹，毛细管可以通过螺丝状连接器旋入，从而方便地更换纳喷雾头。Chen 等[132]报道了在 PMMA 芯片通道口处黏合细毛细管，实现纳喷雾。他们使用该系统进行了 1.5pmol 的牛血清白蛋白的胶上酶解产物的电泳串级质谱检测，装置见图 6.26。

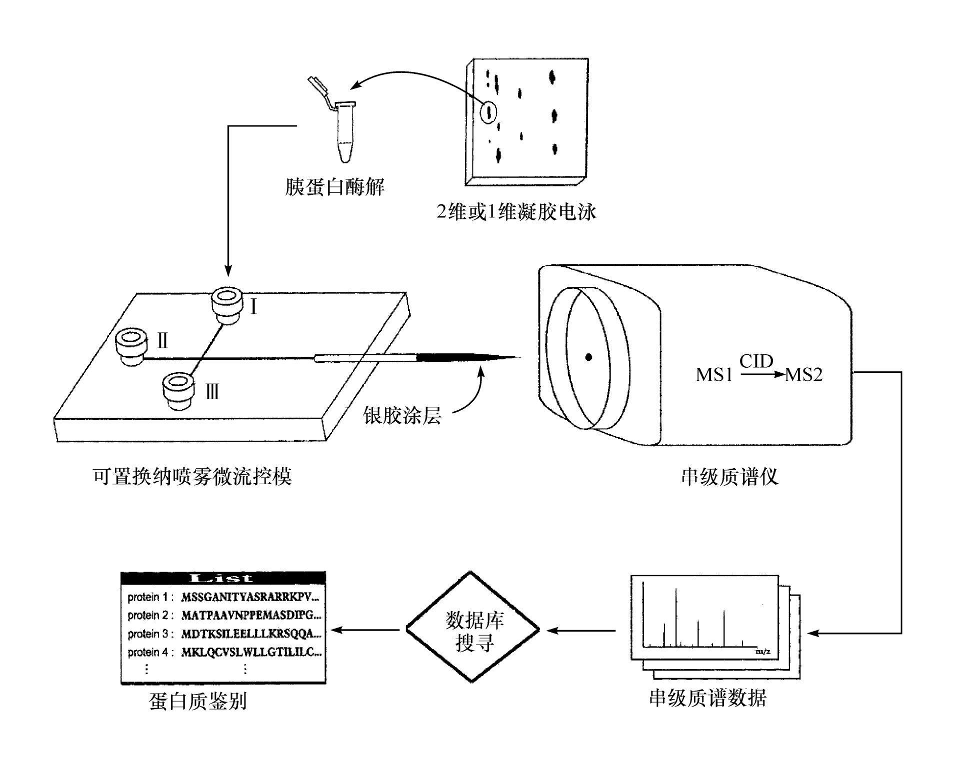


图 6.26　牛血清白蛋白酶解产物电泳串级质谱检测

3）尖锥出口喷雾

微流控芯片-质谱联用的最佳方案是将接口直接加工在芯片上，即使芯片通道出口可以直接作为 ESI 的接口。当前微流控系统-质谱联用发展的一个趋势就是利用微加工技术改造芯片通道出口的形状，以克服平面结构通道出口的缺陷，实现高离子化效率。正如前面所述，喷头形状越尖越好，所以，目前文献报道的接口构

型皆为尖锥形外观，有针状（needle-like）、点状（point-like）和尖状（nib-like）等[133]。这些形状的喷口不但有利于泰勒锥的形成，而且可以实现纳喷雾离子化、喷头和芯片的一体化设计，避免了外接管的死体积，可提高分析灵敏度和分辨率。

由于高聚物材料的易加工性，尖锥出口的喷雾模式都是用高聚物材料制成。这些材料包括聚碳酸酯（PC）、聚对二甲苯材料、PDMS[134]、PMMA、负光刻胶 SU-8[135]等。Kameoka 等[136]将三角形的聚对二甲苯膜黏合在芯片上，这种膜可以直接用作电喷雾的喷口，所形成的三角形喷口防止了样品液在出口处的铺展，从而有助于形成稳定的泰勒锥。Schilling 等[137]在 PMMA 芯片通道出口处磨出了电喷雾喷口，如图 6.27 所示。他们还尝试了不同形状和不同大小的喷嘴，有利于大批量生产廉价的微流控芯片质谱联用系统。

Kim 等[138]使用 3 层光刻技术在 PDMS 材料上制作了并行的 16 通道电喷雾芯片。芯片通道前端排列有三角形喷头，喷口角度在 30°～120°之间，喷雾状态无显著差异。Zhang 等[139]在玻璃芯片上实现了自动进样、高通量的电泳分离-ESI-MS 检测的联用系统。该系统包括进样部分、分离通道和液接接口和小型质谱仪，如图 6.28 所示。

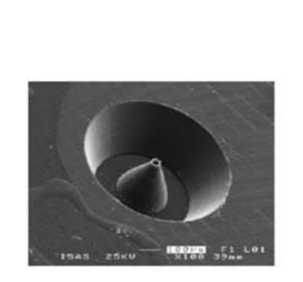


图 6.27　PMMA 材料上磨出的电喷雾喷嘴

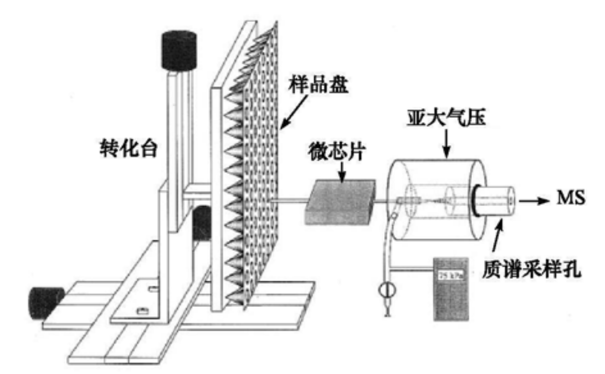


图 6.28　电泳分离-ESI-MS 检测的联用系统示意图

2. 微流控芯片-MALDI-MS 接口

MALDI 离子源对试样要求低，能耐高浓度盐和缓冲剂等非挥发成分；试样量要求少，仅需 1pmol 甚至更低；图谱中单电荷、双电荷的分子离子峰很强，便于信号的重组和解析，与 ESI 相比更适于生物分析检测。但由于诸多因素的限制，这方面的联用仍处于起步阶段。

Liu 等[140]报道了一种芯片和 MALDI 的联用方式。他们使用开管快速电泳芯片，让寡糖和肽的混合物在电驱动下流过微通道进行电泳分离，分离后将溶剂挥发，让加在缓冲溶液中的基质与溶质共结晶后将芯片转移进特殊设计的 FT-MS

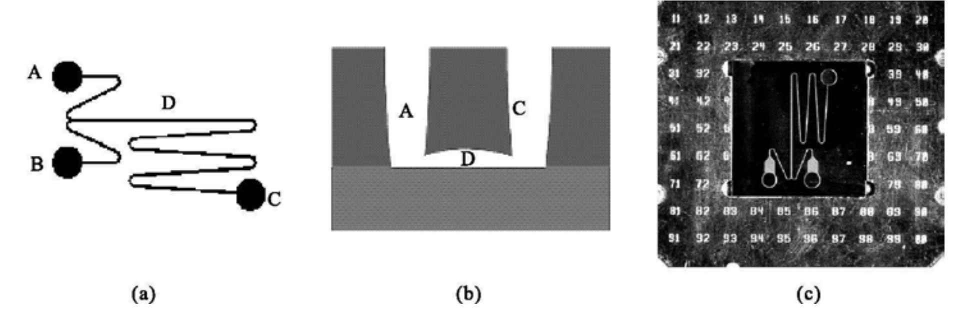


图 6.29　(a)微流控芯片的俯视图;(b)微流控芯片的侧视图;
(c)微流控芯片与 MALDI-MS 集成装置
A,B:进样口;C:出样口;D:反应微通道

的 MALDI 源中,由激光扫描开口通道,将结晶的待测样品离子化。Brivio 等[141]将生化反应的微流控芯片与标准的 MALDI-TOF-MS 样品盘集成,如图 6.29 所示,证明利用质谱仪内部的真空作为泵是一种简单而有效的方法。

6.3　微流控分析在生物分析化学中的应用

微流控芯片分析系统在微型化、集成化和便携化等方面所具有的巨大潜力,以及在微尺寸下的特殊效应,激起了众多科学工作者在该领域研究的热情,使得该领域的基础研究进展迅速,而基础研究成果的不断产生无疑大大的促进和推动了微流控芯片分析系统在包括生物化学、生物医学、高通量药物筛选、分子生物学、司法鉴定、环境检测等各个领域的迅速渗透和发展。

6.3.1　微流控芯片在基因分析中的应用

基因分析是微流控芯片应用最为广泛的领域。基因分析包括核酸的扩增、分离及测序。核酸的扩增、分离在前面一节中都有所介绍,此处不再赘述。核酸的分离是目前微流控分析应用最为广泛的领域。由于微通道内的焦耳热效应可以忽略,能够对样品量进行准确控制,且微芯片电泳的分离能力仅受扩散控制,因而其性能比平板电泳和毛细管电泳更胜一筹,在微流控芯片上已经实现了对寡核苷酸、RNA、DNA 片段以及基因图谱和基因测序的快速、高效分析。在基因分析中,所使用的检测方法有激光诱导荧光(LIF)、质谱(MS)、电化学[142～144]、拉曼光谱[145]、全息折射检测等[146],但最为常用的是利用激光诱导荧光检测器进行检测。

1. 分离介质

由于比传统毛细管电泳的分离距离短得多,微芯片电泳在诸如电动控制、通道

构型以及筛分介质等分离条件的优化方面面临新的挑战。Culbertson 等[147]和 Paegel 等[148]曾深入研究了不同构型的微通道中折叠微通道结构对峰展宽的影响。传统毛细管电泳中使用的交联水溶性聚合物溶液等筛分介质已成功地用于微芯片电泳，线性聚丙烯酰胺及其衍生物、聚二甲基丙烯酰胺、聚环氧乙烷、聚乙烯吡咯烷酮、带有荧光碳链的聚乙二醇、羧乙基纤维素及其各种纤维素的衍生物、多糖等也都已经用于毛细管电泳分离不同大小的核酸分子[149]，其中的一些筛分介质已经用于微芯片电泳中。此外，一些新型的由疏水性和亲水性嵌段组成的热敏性共聚物，如聚醚[150]、接枝了聚环氧乙烷链的聚异丙基丙烯酰胺[151]作为微流控芯片电泳的筛分介质也取得了良好的效果。微流控芯片电泳使用热敏性高聚物作为筛分介质具有特殊的优越性，它不需要压力装置就可方便地把黏稠的高聚物溶液装入微通道内。Buchholz 等[152]构建了一种可以根据温度、pH 或离子强度的变化来改变黏度的开关。这种材料是由不同疏水性的丙烯酰胺衍生物组成的共聚物，它具有可逆温控黏度开关，从室温时的高黏度溶液到升温后低黏度的胶体分散相。而且，这种筛分介质具有高的分离能力和好的 DNA 测序性能(463bp/78min)。Sudor 等[153]引入了另一系列的热相关基质。这些梳状聚合物是由亲水性骨架(聚丙烯酰胺)接枝低临界溶解温度的侧链(聚 N-异丙基丙烯酰胺)组成。这类热增厚性聚合物由于具有在高温时形成暂时性分子间交联的性质，在 DNA 测序中有着明显的优越性，如在低温时为低黏度溶液，因而易于处理，而升高温度时为高黏度溶液，具有优越的筛分能力。

Han 等[154]介绍了无介质分离 DNA 的方法。他们基于所谓的“熵捕捉”原理设计并制作了纳流体通道，用于分离长链 DNA 分子。分离管道由宽区域(1.5～3μm)和窄区域(75～100nm)组成，在每次压缩开始时产生 DNA 尺寸捕捉(图 6.30)。由这种方法产生的移动差异，可以不使用筛分聚合物或脉冲电场就能分离 DNA。这种方法在 1.5cm 的管道内成功分离了 5～160kbp 范围内的片段。他们也使用了多通道平行分离 DNA。微制作方法的简便性、理论模型的可能性，暗示着这些成果在 DNA 分析系统中潜在的应用价值。

2. 双链和单链 DNA 分析和基因型分析

微芯片电泳的主要应用是包括双链 DNA 片段[155～160]、短单链寡核苷酸[161]和核糖体 RNA 片段[162]在内的分析。微芯片上 DNA 基因型分析可快速识别基因，并且能显著的提高其在基因组学、诊断学、遗传药理学和法医检验学等方面的性能。遗传疾病相关基因的识别已在芯片上成功实现，如肌肉营养失调[163]和血色素沉着症[164]。此外，芯片上也实现了用于短串联重复序列分析的超快速等位基因谱分析[165]，在 26mm 的分离距离内仅用不到 2min 的时间就完成了 CSFIPO，TPOX，THOI，VWA 4 个基因座四倍系统的分离，其速度分别比毛细管电泳和平

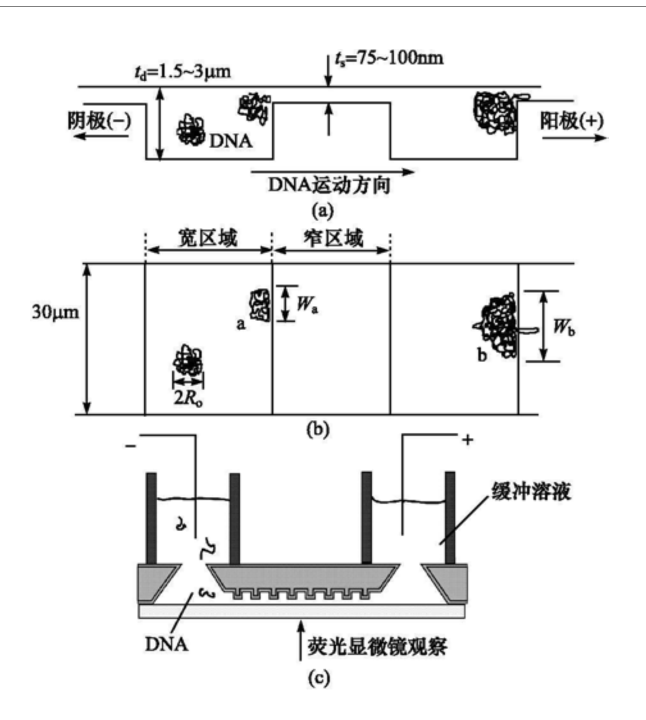


图 6.30 纳流体通道的“熵捕捉”原理

板凝胶电泳提高了 10 倍和 100 倍[166]。

3. 测序和其他应用

大量研究工作已证实了微流控芯片 DNA 测序的可行性。Liu 等[167]在芯片上实现了 20min 内完成读取长度超过 500 个碱基的高速度、高通量的四色测序分析。Shi 等[168]在刻有 96 通道阵列的微器件上完成了高通量 DNA 测序分析。目前，报道的最好结果是每通道约 $1200bp \cdot h^{-1}$，使用 96 通道芯片可以每天 24h 循环产生 2.7Mbp。

微流控芯片和灵敏的荧光检测方法结合在毛细管电泳微芯片上可用于单个 DNA 分子的检测。单分子荧光同步计数技术已用于微流控通道中监测 DNA 的分离，应用雪崩光二极管检测器和在检测区域用电动力学方法或分离柱物理束缚的方法将样品流聚焦[169]。

场反转电泳应用于微芯片上可在比较短的分离长度内有效分析 DNA[170]。该方法应用于 180°角内优化频率周期性转换脉冲电场，此时 DNA 分子表现出区带反转现象和最小的迁移，短寡核苷酸的 20-、40-和 60-链节，在仅 6mm 分离距离内得到有效分离。他们认为该技术可能在单链构象多态性(single strand conformation polymorphism，SSCP)分析中具有巨大的潜在应用价值。

Lin 等[171]提出了一个降低施加电压而仍然保持高电场强度的巧妙方法。他们采用微电极阵列将通道分成许多小分离区，顺序施加较小的电压于适当电极产生了一个可移动的电场。他们还考察了不同的电极排列方式对电场均匀性的影响。

6.3.2　蛋白质分析

基因是遗传信息的携带者，而生命活动的执行者却是蛋白质，即基因表达的产物。随着后基因组时代的到来，蛋白质组学是继基因组学后具有最大商业潜力的领域。蛋白质分析常规方法的典型步骤包括从细胞中提取蛋白质、通过一维或二维凝胶电泳分离和检测、经切割和胶内消解、使用质谱分析该过程中得到的肽类混合物。这种方法分析速度慢，劳动强度大，因此很有必要发展快速、高通量、多样品的系统。而微流控技术正迎合了上述要求，为蛋白质的快速分析提供了新机遇[172]。

生物样品在分析前一般都要进行预处理，对于蛋白质分析来说，蛋白质的纯化和脱盐是一个常遇到的问题，微流控芯片中的微渗析分离器可以快速而有效的清除蛋白质样品中的盐分。如 Xiang 等[173]设计了双微渗析芯片分离系统，实现了根据分子质量的大小进行分级分离，这样不仅可以消除小分子质量组分，如盐的干扰，而且还可以消除大分子质量组分的干扰。芯片结构如图 6.31 所示，采用不同孔径的渗析膜，形成 5 层夹心结构，上层为大孔径的高分子质量截止膜，下层为小孔径的低分子质量截止膜，中间基片上两面都有通道，并通过末端孔连接。通过高分子质量截止膜渗析过来的溶液再通过下层膜除去小分子质量组分，从而获得纯净的目标样品。使用该芯片对原细胞溶菌液进行了纯化与质谱分析。

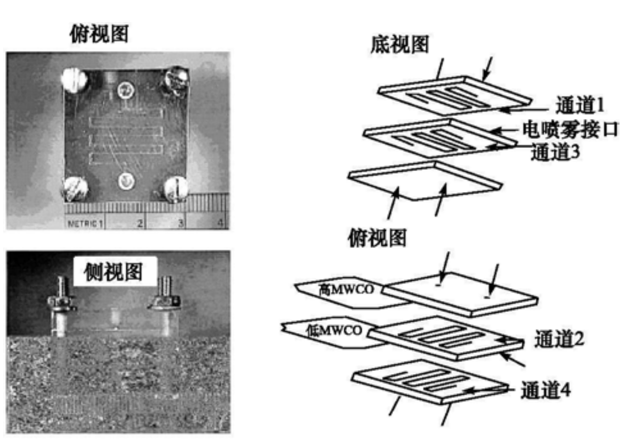


图 6.31　双渗析芯片

微流控芯片上的蛋白质分析技术主要是芯片电泳、芯片电色谱以及二维电泳技术。这3种技术我们在前面都已经介绍,此处不再赘述。微芯片电泳模式,包括微芯片区带电泳、微芯片凝胶电泳、等电聚焦和微芯片电色谱等都已经用于蛋白质的分析。需要指出的是,由于蛋白质在大多数芯片材料上的吸附性能比较强,容易造成峰拖尾而使蛋白质的分离度下降,所以使用微芯片电泳方法进行蛋白质分析时,通常要对微通道内壁进行修饰或在运行缓冲液中加入动态改性剂来减少蛋白质的吸附。如Zhang等[174]利用聚乙二醇(PVA)和聚丙烯酰胺(PAA)涂层在电泳芯片上实现了蛋白质的分离,并取得了很好的效果,蛋白质信号的峰形表明,涂层有效地减少了蛋白质的吸附。详细方法可参阅Doherty等的报道[175]。

自Jacobson[176]的早期工作以来,微芯片上通过区带电泳分离的蛋白质或肽类已经超过数百种。Bousse等[177]将SDS-PAGE与高速微芯片用于蛋白质分析。Badal等[178]将微通道内壁修饰一层热解PDMS的玻璃芯片用于溶菌酶、细胞色素c、核糖核酸酶和荧光标记的羊抗人免疫球蛋白Fab部分的分析检测。Liu等[179]用非键合的柱后标记实现了模型蛋白α-乳白蛋白、β-乳球蛋白A、β-乳球蛋白B的分离检测。Jin等[180]在电泳过程中使用动态标记法在微流控芯片上实现了蛋白的分离检测。

Lazar等[181]利用纳喷雾-MS分析了人血红素的在线酶解产物。Jin等[182]提出了一种利用电渗泵驱动的蛋白消解系统,即蛋白质在电场作用下,直接从丙烯酰胺凝胶中迁移进入微流控体系,在流出过程的同时进行消解。消解β-酪蛋白、细胞色素c、牛血清白蛋白可以在12min内完成。Slentz等[183]在填充有微粒的柱中实现了胰蛋白酶的消解和亲和色谱,分离则在含有整体柱支撑的结构中实现。Petsev等[184]提出了一种基于电场梯度聚焦的聚焦装置,将牛血清白蛋白和藻红蛋白聚焦后,通过逐步改变电泳速度实现了两者的分离。Li等[185]提出了一种集成式模块用于蛋白质组学研究的微系统。这个微系统包括自动进样阀、一个填充有微珠的反相或亲和色谱柱以及可以与纳喷雾连用的阵列分离通道阵列。顺序进样、预富集、分离标准胎和胰蛋白酶消解产物可以达到每小时12个样品的通量,检测限达到5nmol・L^{-1}。Schilling等[186]在微流控芯片上集成了细菌细胞的消解、胞内酶β-半乳糖苷酶的提取以及β-半乳糖苷酶提取物的荧光检测。Kakuta等[187]利用基于微混合器的时间分辨NMR和FT-IR技术研究了化学诱导蛋白质的构象变化。Hansen等[188]则制作并测试了一种用于快速筛选蛋白质结晶条件的微流控芯片。这种芯片有480个主动阀,可以同时进行144个反应,每个反应所消耗的蛋白质仅10nl。而Zheng等[189]则设计了用于筛选数百种蛋白结晶条件的一种微流控设备,每一次结晶所需要消耗的蛋白溶液小于4nl。这些测试是在一个由不可混溶的流体中形成的7.5nl水滴内进行的,每个液滴包含不同配比的蛋白质、沉淀剂、添加剂等。Kato等[190]报道了利用动态涂层在PMMA微芯片上分离了有

很宽范围 pI 和相对分子质量的氨基酸和蛋白质。

6.3.3　其他生化物质分析

微流控芯片用于其他生化物质的分析包括氨基酸分析、神经递质和糖类的分析等。这些生物小分子的分析多是在微芯片电泳上实现的。由于这类生物小分子本身不具有荧光,一般无法用紫外检测,也不能直接用荧光检测。对于氨基酸的分离分析,一般可采用离线衍生或在线衍生(柱前衍生或柱后衍生)等方法使其具有荧光,而后进行荧光检测,或者采用电化学检测如电导或安培检测。对于儿茶酚氨类神经递质,其一般具有电化学活性,多采用电化学方法进行检测。对于糖类分子,虽然其本身不具有电化学活性,但在碱性介质中,能在铜电极上发生催化氧化反应,为其电化学检测提供了一条途径。

Guo 等[191]在聚酯电泳芯片上通过柱前衍生,实现了精氨酸、甘氨酸和苯丙氨酸的分离和检测。其芯片构型图如图 6.32 所示。

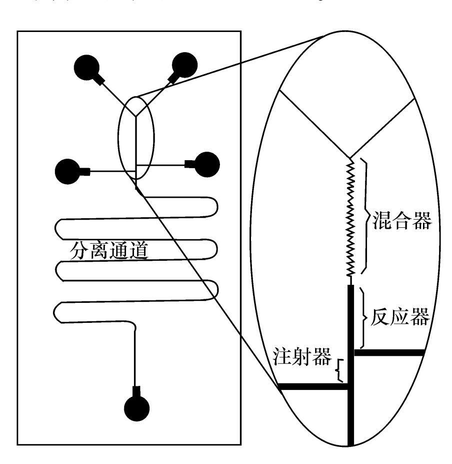


图 6.32　集成了微反应器、T 进样器和分离通道的电泳芯片构型图

Mourzinal 等[192]在 PDMS-玻璃芯片上实现了荧光标记的精氨酸和甘氨酸的分离检测,并考察了微通道表面状态对氨基酸分离的影响。Lin 等[193]在 PDMS 微通道内制备了凝胶整体柱,并用于荧光标记的氨基酸,如甘氨酸、色氨酸、苯丙氨酸和半胱氨酸等的分析。Cellar 等[194]利用多层软光刻技术制作了 PDMS 芯片,通过低速推-拉灌注用于活体内氨基酸神经递质的取样和分析。该芯片包括气动蠕动泵,将人造的脑脊髓液输送到一个推-拉灌注探针,推动样品进行在线衍生化,然后把 OPA 衍生后的氨基酸推进高速毛细管电泳的进样器,电泳分离后由激光诱导荧光检测。Garcia 等[195]使用电泳分离柱端安培检测法测定了果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、半胱氨酸和葡萄糖等。

微芯片电泳电化学检测系统多用神经递质(如多巴胺和肾上腺素)的分离来进行评价。如 Wang 等[196]使用印刷厚膜碳电极在玻璃芯片上实现了肾上腺素和儿茶酚的分离和测定。这方面的测定可见相关综述[197,198]。

参 考 文 献

[1] Shi Y,Simpson P C,Schere J R et al. *Anal. Chem*. 1999,**71**:5354

[2] Emrich C A,Tian H,Medintz I L et al. *Anal. Chem*. 2002,**74**:5076

[3] Manz A,Graber N,Widmer H M. *Sens. Actuators B*. 1990,**1**:244

[4] 方肇伦等. 微流控分析芯片. 北京:科学出版社,2003

[5] 方肇伦. 微流控分析芯片的制作及应用. 北京:化学工业出版社,2005

[6] Soper S A,Ford S M,Qi S et al. *Anal. Chem*. 2000,**72**:643

[7] Lago C L,Silva H D T,Neves C A et al. *Anal. Chem*. 2003,**75**:3853

[8] Liu A L,He F Y,Hu Y L et al. *Talanta*. 2006,**68**:1303

[9] Liu A L,He F Y,Wang K et al. *Lab Chip* 2005,**5**:974

[10] Liu A L,Zhou T,He F Y et al. *Lab Chip*. 2006,**6**:811

[11] 林炳承. 毛细管电泳导论. 北京: 科学出版社,1996

[12] 邓延倬,何金兰. 高效毛细管电泳. 北京: 科学出版社,2000

[13] 陈义. 毛细管电泳技术及应用. 北京: 化学工业出版社,2000

[14] Jansson M,Emmer A,Roeraade J. *J. High. Resolut. Chromatogra. Commun*. 1989,**12**:797

[15] Manz A,Graber N,Widmer H M. *Sens. Actuators B*. 1990,**1**:244

[16] Liu S R,Guttman A. *Trends Anal. Chem*. 2004,**23**:422

[17] Bruin G J M. *Electrophoresis*. 2000,**21**:3931

[18] Rodriguez I,Zhang Y,Lee H K et al. *J. Chromatogr. A*. 1997,**781**:287

[19] Belder D,Ludwig M. *Electrophoresis*. 2003,**24**:3595

[20] Dou Y H,Bao N,Xu J J,Chen H Y. *Electrophoresis*. 2002,**23**,3558

[21] Moore A W,Jacobson S C,Ramsey J M. *Anal. Chem*. 1995,**67**:4184

[22] Culbertson C T,Jacobson S C,Ramsey J M. *Anal. Chem*. 2000,**72**:5814

[23] Effenhauser C S,Paulus A,Manz A et al. *Anal. Chem*. 1994,**66**:2949

[24] Woolley A T,Mathies R A. *Anal. Chem*. 1995,**67**:3676

[25] Effenhauser C S,Bruin G J M,Paulus A et al. *Anal. Chem*. 1997,**69**:3451

[26] Jacobson S C,Ramsey J M. *Anal. Chem*. 1996,**68**:720

[27] Woolley A T,Hadley D,Landre P et al. *Anal. Chem*. 1996,**68**:4081

[28] Shi Y N,Simpson P C,Scherer J R et al. *Anal. Chem*. 1999,**71**:5354

[29] Hofmann O,Che D P,Cruickshank K A et al. *Anal. Chem*. 1999,**71**:678

[30] Mao Q,Pawlisyn J. *Analyst*. 1999,**124**:637

[31] Jindal R,Cramer S M. *J. Chromatogra. A*.2004,**1044**:277

[32] Jacobson S C,Hergenroder R,Koutny L B et al. *Anal. Chem*. 1994,**66**:2369

[33] Soper S A,Henry A C,Vaidya B et al. *Anal. Chim. Acta*. 2002, **470**:87

[34] He B,Tait N,Regnier F. *Anal. Chem*. 1998,**70**:3790

[35] Slentz B E,Penner N A,Regnier F E. *J. Chromatogr*. 2002,**948**:225

[36] Throckmorton D J,Shepodd T J,Singh A K. *Anal. Chem*. 2002,**74**:784

[37] Giddings J C. *Unified Separation Science*, John Wiley and Sons, New York, 1991. 112

[38] Gottschlich N, Jacobson S C, Culbertson C T et al. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 2669

[39] Rocklin R D, Ramsey R S, Ramsey J M. *Anal. Chem.* 2000, **72**: 5244

[40] Ramsey J D, Jacobson S C, Culbertson C T et al. *Anal. Chem.* 2003, **75**: 3758

[41] Herr A E, Molho J I, Drouvalakis K A et al. *Anal. Chem.* 2003, **75**: 1180

[42] Herr A E, Singh A K. *Anal. Chem.* 2004, **76**: 4724

[43] Slentz B E, Penner N A, Regnier F E. *J. Chromatogr. A*. 2003, **984**: 97

[44] Yaralioglu G G, Wygant I O, Marentis T C et al. *Anal. Chem.* 2004, **76**: 3694

[45] Sato K, Tokeshi M, Odake T et al. *Anal. Chem.*, 2000, **73**: 1144

[46] Brody J P, Yager P. *Sens. Actuators A*, 1997, **58**: 13

[47] Jandik P, Weigl B H, Kessler N et al. *J. Chromatogr. A*. 2002, **954**: 33

[48] Kamholz A E, Weigl B H, Finlayson B A et al. *Anal. Chem.* 1999, **71**: 5340

[49] Schiling E A, Kamholz A E, Yager P. *Anal. Chem.* 2002, **74**: 1798

[50] Kurita R, Yabumoto N, Niwa O. *Biosen. Bioelectron.* 2006, **21**: 1649

[51] Severs J C, Smith R D. *Anal. Chem.* 1997, **69**: 2154

[52] Sandlin Z D, Shou M, Shackman J G et al. *Anal. Chem.* 2005, **77**: 7702

[53] Song S, Singh A K, Shepodd T J et al. *Anal. Chem.* 2004, **76**: 2367

[54] Wilding P, Kricka L J, Cheng J et al. *Anal. Biochem.* 1998, **257**: 95

[55] He B, Tan L, Regnier F. *Anal. Chem.* 1999, **71**: 1464

[56] Guijt R M, Baltussen E, van Dedem G W K. *Electrophoresis.* 2002, **23**: 823

[57] Verpoorte E. *Electrophoresis.* 2002, **23**: 677

[58] Schultz N M, Kennedy R T. *Anal. Chem.* 1993, **65**: 3161

[59] Shimura K, Karger B L. *Anal. Chem.* 1994, **66**: 9

[60] Koutny L B, Schmalzing D, Taylor T A et al. *Anal. Chem.* 1996, **68**: 18

[61] Chiem N, Harrison D J. *Anal. Chem.* 1997, **69**: 373

[62] Bromberg A, Mathies R A. *Anal. Chem.* 2003, **75**: 1188

[63] Chiem N H, Harrison D J. *Clin. Chem.* 1998, **44**: 591

[64] Cheng S B, Skinner C D, Taylor J et al. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 1472

[65] Wang J, Ibanez A, Chatrathi M P et al. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 5323

[66] Wang J, Ibanez A, Chatrathi M P. *Electrophoresis.* 2002, **23**: 3744

[67] Eteshola E, Leckband D. *Sens. Actuators B*. 2001, **72**: 129

[68] Sato K, Tokeshi M, Odake T et al. *Anal. Chem.* 2000, **72**: 1144

[69] Choi J W, Ahn C H, Bhansali S et al. *Sens. Actuators B*. 2000, **68**: 34

[70] Lai S, Wang S N, Luo J. *Anal. Chem.* 2004, **76**: 1832

[71] Arenkov P, Kukhtin A. *Anal. Biochem.* 2000, **278**: 123

[72] Mullis K, Falooma F, Scharf S et al. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986, **51**: 263

[73] Northrup M A, Ching M T, White R M et al. *The 7th International Conference on solid-state Sensors and Acutators*, Yokohama., Japan, 1993, 924

[74] Giordano B C, Copeland E R, Landers J P. *Electrophoresis.* 2001, **22**: 334

[75] Khandurina J, McKnight T E, Jacobson S C et al. *Anal. Chem.* 2000, **72**: 2995

[76] Lagally E T, Medintz I, Mathies R A. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 565

[77] Lagally E T,Simpson P C,Mathies R A. *Sens. Actuators B*. 2000,**63**:138
[78] Waters L C,Jacobson S C,Kroutchinina N et al. *Anal. Chem*. 1998,**70**:158
[79] Oda R P,Strausbauch M A,Huhmer A F R et al. *Anal. Chem*. 1998,**70**:4361
[80] Giordano B C,Ferrance J,Swedberg S et al. *Anal. Biochem*. 2001,**291**:124
[81] Yang J N,Liu Y J,Rauch C B et al. *Lab chip*. 2002,**2**:179
[82] Obeid P J,Christopoulos T K,Crabtree H J et al. *Anal. Chem*. 2003,**75**:288
[83] Marcus J S,Anderson W F,Quake S R. *Anal. Chem*. 2006,**78**:956
[84] Kopp M U,de Mello A J,Manz A. *Science*. 1998,**280**:1046
[85] Chou C F,Changrani R,Roberts P et al. *Microelectron. Eng*. 2002,**61**/**62**:921
[86] 刘金华,殷学锋,徐光明等. 高等学校化学学报. 2003,**24**:232
[87] 刘金华,殷学峰,方肇伦. 高等学校化学学报. 2004,**25**:30
[88] Soper S A,Murphy M C,McCarley R L et al. *Micro Total Analysis Systems* 2001,Kluwer Academic Publishers,The Netherlands,2001.459
[89] Sun K,Yamaguchi A,Ishida Y et al. *Sens. Actuators B*. 2002,**84**:283
[90] Liu J,Enzelberger M,Quake S. *Electrophoresis*. 2002,**23**:1531
[91] Li P C,Harrison D J. *Anal. Chem*. 1997,**69**:1564.
[92] Fiedler S,Shirley S G,Schnelle T et al. *Anal. Chem*. 1998,**70**:1909
[93] Fu A Y. et al *Nat. Biotechnol*. 1999,**17**:1109
[94] Dittrich P S,Schwille P. *Anal. Chem*. 2003,**75**:5767
[95] Fu A Y,Chou H P,Spence C et al. *Anal. Chem*. 2002,**74**:2451
[96] Krueger J et al. *J. Micromech. Microeng*. 2002,**12**:486
[97] Wolff A et al. *Lab. Chip*. 2003,**3**:22
[98] MacDonald M P,Spalding G C,Dholakia K. *Nature*. 2003,**426**:421
[99] Wang M M et al. *Nat. Biotechnol*. 2005,**23**:83
[100] Shirasaki Y,Tanaka J,Makazu H et al. *Anal. Chem*. 2006,**78**:695
[101] Mandy F F,Bergeron M,Minkus T. *Transfus. Sci*. 1995,**16**:303
[102] Blankenstein G,Larsen U D. *Biosen. Bioelectron*. 1998,**13**:427
[103] Grewe M,Gross A,Fouckhardt H. *Appl. Phys. B Laser and optics*. 2000,**70**:839
[104] Hung C I,Ke B J,Huang G R et al. *ASME J. Fluids Eng*. 2001,**123**:672
[105] Lee G B,Lin C H,Chang G L. *Sens. Actuators A*. 2003,**103**:165
[106] Culbertson C T,Alarie J P,McClain M A et al. *Micro Total Analysis* 2000,Kluwer Academic Publishers,The Netherlands,2000. 103
[107] McClain M A,Culbertson C T,Jacobson S C et al. *Anal. Chem*. 2001,**73**:5334
[108] Fu L M,Yang R J,Lin C S et al. *Anal. Chim. Acta*. 2004,**507**:163
[109] Larsen U D,Norring H,Telleman P. *In Proc. of Micro Total Analysis Systems* 2000,Kluwer Academic Publishers,The Netherlands,2000. 103～106
[110] Gawad S,Schil L,Renaud P. *Lab Chip*. 2001,**1**:76
[111] Voldman J,Toner M,Gray M L et al. *Transducers*. 2001,**1**:322
[112] Morishima K,Arai F,Fukuda T. *Anal. Chim. Acta*. 1998,**365**:273
[113] McClain M A,Cullbertson C T,Jacobson S C et al. *Micro Total Analysis Systems* 2001. Kluwer Academic Publishers,The Netherlands,2001.301

[114] Schilling E A, Kamholz A E, Yager P. *Anal. Chem.* 2002, **74**: 1798
[115] Waters L C, Jacobson S C, Kroutchinina N et al. *Anal. Chem.* 1998, **70**: 158
[116] Yang M, Li C W, Yang J. *Anal. Chem.* 2002, **74**: 3991
[117] Irimia D, Tompkins R G, Toner M. *Anal. Chem.* 2004, **76**: 6137
[118] Marcus J S, Anderson W F, Quake S R. *Anal. Chem.* 2006, **78**: 3084
[119] Peng X Y, Li P C H. *Anal. Chem.* 2004, **76**: 5273
[120] Smith R D, Shen Y, Tang K. *Acc. Chem. Res.* 2004, **37**: 269
[121] Ramsey R S, Ramsey J M. *Anal. Chem.* 1997, **69**: 1174
[122] Fenn J B, Mann M, Meng C K et al. *Science.* 1989, **246**: 64
[123] Wilm M, Shevchenko A, Howthaeve T et al. *Nature.* 1996, **379**: 466
[124] Ramsey R S, Ramsey J M. *Anal. Chem.* 1997, **69**: 1174
[125] Xue Q, Foret F, Dunayevskiy Y M et al. *Anal. Chem.* 1997, **69**: 426
[126] Rohner T C, Rossier J S, Girault H H. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 5353
[127] Li J, Thibault P, Bings N H et al. *Anal. Chem.* 1999, **71**: 3036
[128] Ceriotti L, de Rooij N F, Verpoorte E. *Anal. Chem.* 2002, **74**: 639
[129] Meng Z, Qi S, Soper S A, Limbach P A. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 1286
[130] Lazar I M, Ramsey R S, Jacobson S C et al. *J. Chromatogr. A* 2000, **892**: 195
[131] Lazar I M, Ramsey R S, Sundberg S et al. *Anal. Chem.* 1999, **71**: 3627
[132] Chen S H, Sung W C, Lee G B et al. *Electrophoresis.* 2001, **22**: 3972
[133] LeGac S, Arscott S, Rolando C. *Electrophoresis.* 2003, **24**: 3640
[134] Huikko K, Ostman P, Grigoras K et al. *Lab Chip* 2003, **3**: 67
[135] Arscott S, Thomy V, Fourrier J et al. *J. Micromech. Microeng.* 2004, **14**: 619
[136] Kameoka J, Orth R, Ilic B et al. *Anal. Chem.* 2002, **74**: 5897
[137] Schilling M, Nigge W, Rudzinski A et al. *Lab Chip.* 2004, **4**: 220
[138] Kim J S, Knapp D R. *Electrophoresis.* 2001, **22**: 3993
[139] Zhang B, Foret F, Karger B L. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 2675
[140] Liu J, Tseng K, Garcia B et al. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 2147
[141] Brivio M, Fokkens R H, Verboom W et al. *Anal. Chem.* 2002, **74**: 3972
[142] Gavin P F, Ewing AG. *Anal. Chem.* 1997, **69**: 3838.
[143] Woolley A T, Lao K Q, Glazer A N et al. *Anal. Chem.* 1998, **70**: 684
[144] Gawron A J, Martin R S, Lunte S M. *Electrophoresis.* 2001, **22**: 243
[145] Walker P A, Morris M D, Burns M A. *Anal. Chem.* 1998, **70**: 3766
[146] Burrgraf N, Krattiger B, de Mello A J et al. *Analyst.* 1998, **123**: 1443
[147] Culbertson C T, Jacobson S C, Ramsey J M. *Anal. Chem.* 1998, **70**: 3781
[148] Paegel B M, Hutt L D, Simpson P C et al. *Anal. Chem.* 2000, **72**: 3030
[149] Albarghouthi M N, Barron A E. *Electrophoresis* 2001, **21**: 4946
[150] Wu C, Liu T, Chu B. *Electrophoresis.* 1998, **19**: 231; Liang D, Chu B. *Electrophoresis.* 1998, **19**: 2447
[151] Liang D H, Song LG, Zhou S Q et al. *Electrophoresis.* 1999, **20**: 2856
[152] Buchholz B A, Doherty E A S, Albareghouthi M N et al. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 157
[153] Sudor J, Barbier V, Thirot S et al. *Electrophoresis.* 2001, **22**: 720
[154] Han J, Craighead H G. *Science.* 2000, **288**: 1026

[155] Effenhauser C S,Bruin G J M,Paulus A. *Electrophoresis*. 1997,**18**:2203
[156] Woolley AT,Mathies R A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994,**91**:11348
[157] McCormick R M,Nelson R J,Alonso-Amigo M G et al. *Anal. Chem*. 1997,**69**:2626
[158] Effenhauser C S,Bruin G J M,Paulus A et al. *Anal. Chem*. 1997,**69**:3451
[159] Duffy D C,McDonald J C,Schueller O J A et al. *Anal. Chem*. 1998,**70**:4974
[160] Ronai Z,Barta C,Sasvari-Szekely M et al. *Electrophoresis*. 2001,**22**:294
[161] Effenhauser C S,Paulus A,Manz A et al. *Anal. Chem*. 1994,**66**:2949
[162] Ogura M,Agata Y,Watanabe K et al. *Clin. Chem*. 1998,**44**:2249
[163] Cheng L,Waters L C,Fortina P et al. *Anal. Biochem*. 1998,**257**:101
[164] Woolley A T,Sensabaugh G F,Mathies R A. *Anal. Chem*. 1997,**69**:2181
[165] Schmalzing D,Koutny L,Chisholm D et al. *Anal. Biochem*. 1999,**270**:148
[166] Schmalzing D,Koutny L,Adourian A et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997,**94**:10273
[167] Liu S R,Shi Y N,Ja W W et al. *Anal. Chem*. 1999,**71**:566
[168] Shi Y,Simpson P C,Schere J R et al. *Anal. Chem*. 1999,**71**:5354
[169] Haab B B,Mathies R A. *Anal. Chem*. 1999,**71**:5137
[170] Ueda M,Endo Y,Abe H et al. *Electrophoresis*. 2001,**22**:217
[171] Lin Y C,Wu W D. *Sens. Actuators B*. 2001,**73**:54
[172] Lion N,Rohner T C,Girault H H. *Electrophoresis*. 2003,**24**:3533
[173] Xiang F,Lin Y,Wen J et al. *Anal. Chem*. 1999,**71**:1485
[174] Zhang B L,Foret F,Karger B L. *Anal. Chem*. 2000,**72**:1015
[175] Doherty E A S,Meagher R J,Albarghouthi M N et al. *Electrophoresis*. 2003,**24**:34
[176] Jacobson S C,Hergenroder R,Koutny L B et al. *Anal. Chem*. 1994,**66**:1114
[177] Bousse L,Mouradian S,Minalla A et al. *Anal. Chem*. 2001,**73**:1207
[178] Badal M Y, Wong M, Chiem N et al. *J. Chromatogr*. A. 2002, 947, 277
[179] Liu Y J,Foote R S,Jacobson S C et al. *Anal. Chem*. 2000,**72**:4608
[180] Jin L J,Giordano B C,Landers J P. *Anal. Chem*. 2001,**73**:4994
[181] Lazar I M,Ramsey R S,Ramsey J M. *Anal. Chem*. 2001,**73**:1733
[182] Jin L J,Ferrance J,Sanders J C et al. *Lab Chip*. 2003,**3**:11
[183] Slentz B E,Penner N A,Regnier F E. *J. Chromatogr. A*. 2003,**984**:97
[184] Petsev D N,Lopez G P,Ivory C F et al. *Lab Chip*. 2005,**5**:587
[185] Li J J,LeRiche T,Tremblay T L et al. *Mol. Cell. Proteomics*. 2002,**1**:157
[186] Schilling E A,Kamholz A E,Yager P. *Anal. Chem*. 2002,**74**:1798
[187] Kakuta M,Jayawickrama D A,Wolters A M et al. *Anal. Chem*. 2003,**75**:956; Kakuta M,Hinsmann P,Manz A,Lendl B. *Lab Chip*. 2003,**3**:82
[188] Hansen C L,Skordalakes E,Berger J M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002,**99**:16531
[189] Zheng B,Roach L S,Ismagilov R F. *J. Am. Chem. Soc*. 2003,**125**:11170
[190] Kato M,Gyoten Y,Sakai-Kato K et al. *Electrophoresis*. 2005,**26**:3682
[191] Guo Y,Uchiyama K,Nakagama T et al. *Electrophoresis*. 2005,**26**:1843
[192] Mourzina1 Y,Steffen1 A,Kalyagin1 D et al. *Electrophoresis*. 2005,**26**:1849
[193] Zeng H L,Li H F,Wang X et al. *Talanta*. 2006,**69**:226
[194] Cellar N A,Burns S T,Meiners J C et al. *Anal. Chem*. 2005,**77**:7067

[195] Garcia C D, Henry C S. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 4778

[196] Wang J, Pumera M, Chatrathi M P et al. *Electroanalysis*. 2002, **14**: 1251

[197] Wang J. *Talanta*. 2002, **56**: 223

[198] Vandaveer I V W R, Pasas-Farmer S A, Fischer D J et al. *Electrophoresis*. 2004, **25**: 3528

第 7 章　免疫分析与印迹技术

近年来，由于免疫生物学的发展，新的免疫理论、技术与方法不断涌现，抗原、抗体与免疫大分子的结构与功能研究取得了重大进展。利用免疫应答过程进行免疫诊断和治疗的实验技术日趋成熟。通过抗原与抗体之间的特异性反应，对抗原或抗体进行量或质的免疫分析方法得到了长足发展[1]。免疫反应最大的特点就是高度的特异性，即抗体对抗原的特异性识别，其中专一性可超过酶对底物的识别水平[2]。由于动物的免疫应答系统可被称为“抗原”的外源性物质激活而有针对性地产生“抗体”一类的蛋白质[3,4]，免疫系统简直可以被认为是产生特异性试剂的合成机器，为人们提供了取之不竭的特异分析试剂[5]。抗原与抗体的特异性不仅可在体内进行，还可在体外进行，这使免疫分析技术的应用远远超出了免疫学、医学，甚至生命科学的范围，成为一类微量、灵敏、快速的检测方法，对疾病的诊断、疗效评价、预后判断和防治都有着极其重要的意义[6]。本章着重介绍抗原-抗体反应的基本原理、免疫分析方法及与免疫认别具有类似机制的分子印迹和分子识体技术。

7.1　抗原-抗体反应的基本原理

7.1.1　抗原与抗体

抗原是一类能够刺激动物机体的免疫系统，诱导机体发生免疫应答产生体液免疫的抗体和(或)细胞免疫的效应淋巴细胞，并在体内外与之发生特异反应的物质[3,4,7]。抗原物质具有免疫原性和免疫反应性两个基本特性。所谓免疫原性是指引起免疫应答的性能，可以用特异抗体的形成与(或)特异免疫效应淋巴细胞的产量来衡量。免疫反应性又称抗原特异性或专一性，是指抗原能与免疫应答产物——抗体和致淋巴细胞受体在体内外相互作用起反应的性能。

抗原的分类方法有很多，现主要依据抗原的来源分类，包括天然抗原、人工抗原和合成抗原 3 类。天然抗原是指自然界存在的细胞、细菌、病毒、蛋白质、核酸、多糖和结合蛋白；人工抗原是指通过人工合成的方法，将半抗原(有机小分子)结合到蛋白质上形成的完全抗原或是经人工化学改造的天然抗原；合成抗原是化学合成的分子，如多肽类抗原。在医学上主要的抗原包括病原微生物、细菌外毒素、类毒素和抗毒素、白细胞分化抗原、血性抗原、自身抗原、肿瘤抗原、主要组织相容性抗原和噬异性抗原。

构成抗原分子的物质主要是蛋白质，包括脂蛋白、糖蛋白和核蛋白等，小分子

的多肽、多糖也有免疫原性。抗原的免疫原性与抗原分子大小有密切关系，一般认为分子质量低于 5000～10 000Da 的物质是没有免疫原性的，大分子比小分子物质免疫原性更强。

抗体是动物机体被入侵的抗原刺激后，在被抗原刺激的免疫应答中由 B 淋巴细胞分化的浆细胞产生的一类糖蛋白[4]。抗体本身是一类复杂的蛋白质，因而对异种动物具有免疫原性，可以诱导不同动物产生相应抗体，即抗抗体。抗体的这种特异性称为抗体(作为)抗原的特异性，或称为抗体的抗原特异性。抗体的抗原特异性与抗体特异性是完全不同的概念。

抗体能与抗原发生特异性结合，产生各种免疫效应的球蛋白分子或“免疫球蛋白”，以 Ig 表示。抗体是体液免疫的效应分子，是由免疫系统中的 B 淋巴细胞产生，以分泌形式分布于血液和组织液中或结合在 B 淋巴细胞膜上作为抗原的受体[8]。

在血清或血浆凝固后，析出的黄色液体称为血清，抗原免疫后的动物血清中含有大量能与相应抗原结合的抗体分子，称为抗血清。血清蛋白质经电泳分离后显现出不同的迁移率，依次为白蛋白，α、β、γ 球蛋白 4 个主要部分，如图 7.1 所示。抗体活性存在于从 α 到 γ 这一广泛区域。免疫球蛋白具有相似的结构，其基本结构(Ig 单体)均由 4 条(两对)多肽链，即两条相同的重链(H 链)和两条相同的轻链(L 链)借链间的二硫键连接组成，其中糖基存在于重链上。H 链分子质量相对较大，约为 50 000Da，由 440～570 个氨基酸残基组成。L 链分子质量约为25 000Da，由 214 个氨基酸残基组成。整个 Ig 分子单体是 Y 形，如图 7.2 所示。

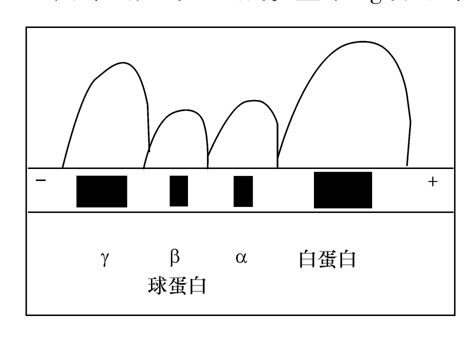


图 7.1　血清蛋白电泳

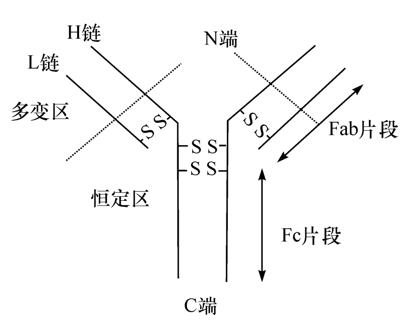


图 7.2　IgG 的分子结构

对人而言，根据重链恒定区氨基酸组成和排列顺序(即抗原特异性)的不同，可将 Ig 重链分为 5 类，分别以 γ、μ、α、δ 与 ε 表示[9]。因此免疫球蛋白相应地分为 IgG(γ)、IgM(μ)、IgA(α)、IgD(δ)和 IgE(ε)5 类，它们的相对分子质量分别为 1.6×10^5、1.0×10^6、1.5×10^5、1.8×10^5 和 2.0×10^5，分别占血清免疫球蛋白的 75%、10%、15%、约 0.2%和 0.002%。IgD 在血清中的含量很低，约有 2×10^{-2}～3×10^{-2} mg · ml^{-1}，半衰期只有 3 天。它在调节抗体的反应中发挥作用，是 B 细胞

成熟的标志。IgE 在血清中的含量极低(3×10^{-4} mg • ml^{-1})，与速发型的过敏反应密切相关。α 链、μ 链和 γ 链还可以进一步分为不同的亚类，人 α 链为 α_1、α_2，μ 链为 μ_1、μ_2，γ 链为 γ_1、γ_2、γ_3、γ_4，因而 IgG、IgA 和 IgM 又分为 8 种亚类即 IgG(γ_1，γ_2，γ_3，γ_4)、IgA(α_1，α_2)和 IgM(μ_1，μ_2)。

用一种纯抗原免疫动物，可获得与该抗原专一结合的抗体，该抗体存在于免疫动物的血清中，因此又称为抗血清。经离子交换层析，从被免疫的动物血清中获得的抗体为多克隆抗体。这一过程只是类别的纯化，虽然用于免疫分析的效果良好，但缺点是抗体不均一，对抗原的专一性抗体只是其中的一小部分，来源是间断的，有较大的批间差别。

单克隆抗体是由一个 B 淋巴细胞或浆细胞克隆所产生的免疫球蛋白，这一技术自 20 世纪 70 年代发展以来，已经成熟。由于单克隆抗体是针对抗体某一个决定簇的，因而是一种均质的高特异性抗体，且可在体外培养液中继续培养，或接种在小鼠腹腔内传代，大量制备。

7.1.2　抗原-抗体反应

抗体能特异性地识别相应的抗原，并与之结合。这种结合可以是游离形式的，也可以是结合在细胞表面的。它只局限于大分子的表面特定部位，即抗原决定簇和抗体结合位点之间，且以亲和力的作用方式结合在一起。抗原-抗体反应在体外也能发生，是非共价的、可逆的。结合力是分子间的亲和力，包括氢键、范德华力、静电作用力和疏水作用等，其特性符合许多化学反应的基本原理。抗体和与之结合的抗原在分子结构上的互补性决定了反应的高度特异性。同时由于抗体分子结构的特点以及抗原分子结构的多样性，抗原-抗体的结合反应表现出复杂性。

抗原-抗体的结合强度在一定条件下取决于抗原与抗体的亲和力，其反应可用下式表示：

$$\mathrm{Ag} + \mathrm{Ab} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{AgAb} \tag{7.1}$$

式中，AgAb 是抗原与抗体的复合物，根据质量作用定律，

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[\mathrm{AgAb}]}{[\mathrm{Ag}][\mathrm{Ab}]} \tag{7.2}$$

式中，[Ag]、[Ab]和[AgAb]分别是抗原、抗体与抗原-抗体复合物的平衡浓度；平衡常数 K 为亲和常数，又称为结合常数；k_1，k_2 分别为结合和离解反应速率常数，单位分别为 mol^{-1} • L • s^{-1} 和 s^{-1}。K 值越大，结合能力越强，亲和力越大。亲和力的大小依赖于抗体的结合位点和抗原决定簇在空间上的密合程度以及相互作用力的性质，它与溶液温度、pH 和离子强度等因素有关。当 K 在 10^7～10^{12} mol^{-1} • L 时，为高亲和力抗体；$K<10^7$ mol^{-1} • L 时，为低亲和力抗体。当抗原结构发生某

些微小改变时，会引起抗原-抗体亲和力的很大变化。

抗原与抗体的结合是可逆的，因此可利用亲和层析法分离纯化抗原或抗体，利用待测抗原和标准抗原与抗体的竞争结合，可进行抗原或抗体的定量测定[10]。

抗体与多价抗原形成的复合物大多数能形成沉淀，沉淀反应可用于研究抗体与大分子的结合特征。在一定量的抗体中，逐渐增加抗原浓度，沉淀的形成与抗原抗体的比例密切相关。图 7.3 所绘的是典型的单特异性沉淀曲线，它可分为 3 个区域，即抗体过量区、适量区和抗原过量区。在抗原抗体适量区形成大量沉淀。在抗原与抗体相遇时，不论二者比例如何，很快发生特异结合，几秒钟内完成，称为初级反应阶段。从特异结合到可见沉淀形成称为次级反应阶段，这阶段常需很长时间，除与两者比例有关外，pH 与离子强度及补体的存在也影响沉淀的形成。沉淀的形成机制一般用 1934 年 Marrack 等提出的网格理论来解释：一个抗体与两个抗原上相同的决定簇结合，一个抗原分子也与多个抗体分子结合，从而形成互相交联的网格，当聚集到一定大小时，就产生沉淀。

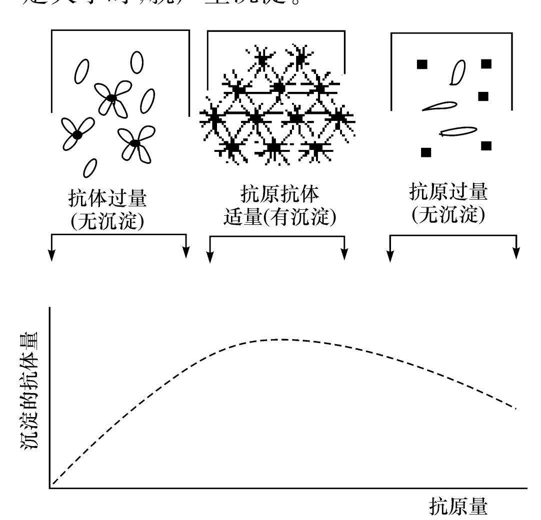


图 7.3　抗原-抗体反应与沉淀的形成

7.2　可见性免疫反应及其分析应用

与抗原与抗体结合相关的免疫分析方法几乎可以说是目前最特异、最灵敏、用途最广泛的生物学检测方法[11]。抗原与抗体结合后，只有出现可见的反应，如凝集、溶血、沉淀实验等，或用荧光素、酶、放射核素等标记方法提高可测性，才便于在免疫检测中运用。这里首先讨论可见性的免疫反应及其分析应用。

可见性反应的出现，对抗原和抗体浓度的合适比例要求远高于对彼此的绝对

量方面的要求。也就是说,一方面在进行免疫检测时要注意抗原抗体的用量;另一方面只要提高可见度或可测性,便可大大提高免疫检测方法的灵敏度。利用沉淀反应的免疫检测方法是临床上常用的方法,该方法是基于抗原与抗体结合形成抗原-抗体复合物沉淀而进行抗原的定性与定量,其优点是分析过程中的检测相不需与过量试剂分离,设备简单,费用低。沉淀反应方法通常又分为絮状沉淀反应、环状沉淀反应、单向扩散和双向扩散等。以双向扩散最为常用,它是利用琼脂凝胶作为介质的一种沉淀反应。

7.2.1　溶液中的抗原-抗体的沉淀反应

在体外,当抗体与相应抗原二者浓度比例适当时,一个抗原分子与多个抗体分子结合,形成互相交联的网格,发生免疫沉淀反应。免疫沉淀反应广泛用于抗原或抗体的定性及定量分析。

当液相中形成的沉淀不易观察时,可利用免疫复合物对入射光的散射测定吸光度即浊度,或直接测定散射光即用散射比浊法来进行检测,这种方法称为免疫浊度法。免疫浊度法检测时抗血清必须对抗原具有高的亲和力,以致在低浓度下即可形成复合物,从而减小试剂的背景浊度干扰,并可降低费用。它早期主要用于血清、尿和脑脊液中蛋白质含量的测定。与其他免疫分析方法(如放射免疫测定、酶联免疫吸附试验等)相比,免疫浊度法简便快速,易于自动化,无放射性核素污染,适合大批量标本同时检测。该方法的缺点是特异性稍差,灵敏度不如可见光与紫外光谱分析等方法高,并与样品溶液的清澈度有关,易受血脂的影响,造成假阳性。此外,当抗原或抗体大大过剩时,会出现可溶性复合物,易造成误差。在检测时需维持反应管中抗体始终过剩,这个值需要预先测定。

另一种方法是利用在抗原-抗体溶液的分界面形成的沉淀进行判断,即环状沉淀试验。其方法是将小试管中底部加入抗原溶液,在上层轻轻辅上不同稀释倍数的抗体溶液,使抗原抗体溶液不相混合,在 37℃下温育后 10～20min,在界面上形成白色沉淀线。在下层抗原溶液中事先加入 10％蔗糖或甘油,可使界面更好地形成。这种方法最简单,但不能做定量测定。

7.2.2　凝集反应

细菌和红细胞等颗粒抗原与相应抗体结合后,可出现肉眼可见的凝集现象,称为凝集反应。早在 1896 年,这一特点就被用于使伤寒患者的血清与伤寒杆菌发生特异性的凝集,有效地诊断伤寒。在此基础上,1901 年,Landsteiner 发现了人类血型,并于 1930 年获得诺贝尔奖。该方法灵敏度高、方法简便,广泛用于临床。

利用颗粒抗原在适当电解质的参与下直接与相应抗体结合出现的凝集现象,称为直接凝集反应,反应中的抗原称为凝集原,抗体称为凝集素。由于细胞表面电

荷与 pH、离子强度和温度有关，凝集试验易受外界因素的影响。通常是在 pH6～8、37℃和 0.9% NaCl 存在下进行。它主要是一种定性检测方法，如进行人的 A、B、O 血型鉴定。用于半定量检测时，凝集试验可将标本做一系列对倍稀释，反应后以出现阳性的最高稀释度作为滴度。

将可溶性抗原（或抗体）吸附于适当大小的颗粒性载体表面，然后与相应抗体（或抗原）作用，在适当电解质的参与下，出现的特异性凝集现象称为间接凝集反应。由于它适用于各种可溶性抗原的检测，其敏感度又高于沉淀反应，因此被广泛用于临床。

间接凝集反应根据致敏用的试剂和反应方式不同又分为 4 类：用抗原致敏载体检测标本中相应抗体的正向间接凝集反应；用特异抗体致敏载体检测标本中相应抗原的反向间接凝集反应；诊断试剂为用抗原致敏的载体及相应的抗体，用于检测标本中是否存在与致敏载体相同的抗原的间接凝集抑制反应；利用金黄色葡萄球菌菌体细胞壁中含有的 A 蛋白具有与 IgG 的 Fc 片段结合的特性，将其与 IgG 抗体连接，制成抗体致敏的颗粒载体，与相应抗原反应出现反向间接凝集反应，这一反应被称为协同凝集反应，也适用于细菌的直接检测，是微生物学检验的一种方法。

7.2.3　免疫扩散法

抗原抗体可在半透明的半固相介质——凝胶中进行沉淀实验。抗原分子和抗体分子在凝胶介质中扩散形成浓度梯度，抗原和抗体在比例合适的一定扩散部分相遇形成沉淀线。因此，如果将适当浓度的抗体混于琼脂（0.8%～1%）中，琼脂凝固后，打一小孔，在小孔中加入待测抗原溶液后，抗原分子由小孔开始扩散，形成抗原的浓度梯度，在适当的抗原浓度梯度将产生免疫沉淀，出现沉淀环。环的半径与抗原浓度有关，其面积与抗原的初始浓度成正比。这一原理即是单向扩散法，它是 Mancini 在 1965 年提出的。通过与已知抗原浓度形成的沉淀线的面积进行比较，可确定被测抗原浓度，如图 7.4 所示。单向免疫扩散法常用于测定血清中 IgG、IgM、IgA 及抗体的含量。

另一种方法是在琼脂板上的相邻两个孔中分别滴入抗原和抗体，抗原与抗体分子在向四周扩散时在两孔中间相遇，在浓度比例合适时形成沉淀线。这种方法称为双向扩散法，又称 Ouchterlony 法，它可用于分析抗原间的血清学关系和抗体间的差异。双向扩散法的操作非常简单，用生理盐水配制 1%～1.5%的琼脂，取一定量倒在载玻片上，凝固后打孔，加样后在 37℃保温 12～24h，便可观察结果。在中心孔滴入抗原，外周孔滴入 2 倍稀释的抗体，可用于测定抗体效价。如在中心孔滴入抗体，外周孔滴入抗原，则可定性检测抗原。

相邻孔中不同抗原与同一抗血清反应形成的沉淀线形状的变化显示抗原间是

否存在共同的抗原决定簇。当两种抗原完全一致时,两条沉淀线完全融合。当两抗原只有部分抗原决定簇相同,则出现一突出的小刺,结果如图 7.5 所示。该方法灵敏度不高,形成沉淀线需较长时间(18～24h)。为了克服免疫扩散法的这一缺点,Laurell 在 1966 年提出了免疫电泳方法。

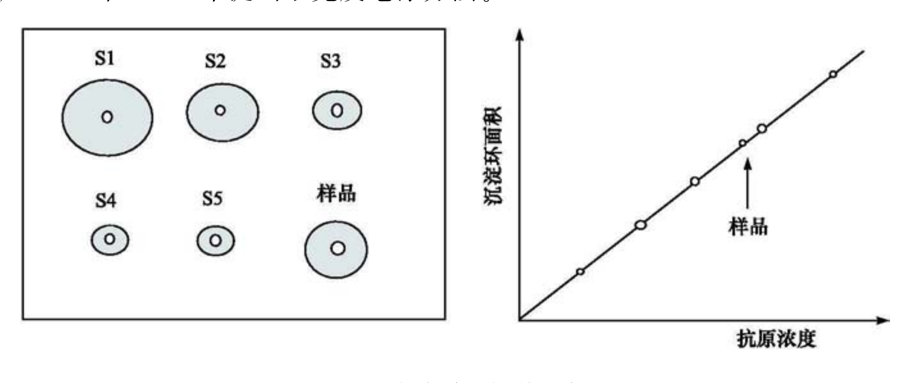


图 7.4 免疫单向扩散示意图

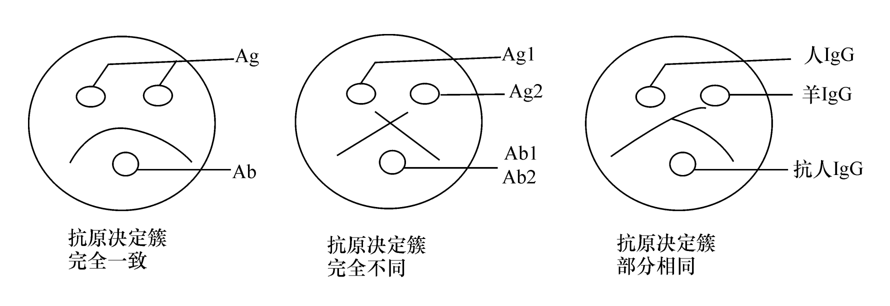
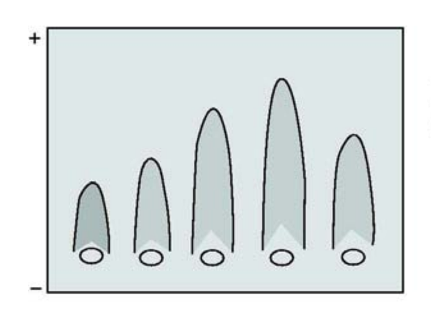


图 7.5 免疫双扩散示意图

7.2.4 免疫电泳法

免疫电泳法是利用蛋白质在凝胶中电泳迁移率的不同而被分离开来的特性与免疫扩散法结合在一起进行的分析方法。这种方法提高了上述方法的分辨率和灵敏度。该方法与单向免疫扩散法类似,先要将抗体混入凝胶中。电泳常在 pH8.6 时进行,此时抗体的迁移不大,而混合的抗原与蛋白质带负电荷,在电场作用下由负极向正极迁移,沿着电泳方向形成火箭形沉淀线,如图 7.6 所示,因此该方法又称为火箭电泳法。沉淀线的峰高与抗体浓度成正比,可用于定量测定,但只能测定 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 以上的含量。用少量 ^{125}I 标记的标准量抗原和被检抗原共同电泳,在含抗体的琼脂中形成不可见的火箭峰,经洗涤干燥后,用 X 射线乳胶片显影,这就是放射自显影技术。根据自显影火箭峰的降低程度(竞争法)可计算出抗原的浓度。

常用的免疫电泳还有两种,即血清免疫电泳和对流免疫电泳。血清免疫电泳是传统的方法,其技术原理是区带电泳和免疫双扩散的结合。在琼脂凝胶内,蛋白



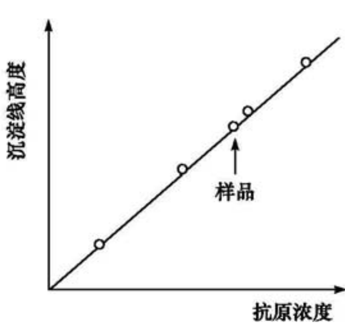


图 7.6　火箭电泳沉淀线及其检测原理

质抗原经电泳后，按其分子质量的大小和所带电荷的多少分成若干区带（5～8带），再在蛋白质迁移轴的两侧或两样本之间挖一长槽，注入已知抗体，经3℃保温18～24h双向扩散后，抗原与抗体在最恰当的位置相结合，形成可见的沉淀线。可根据沉淀线的位置和数量确定某种或某些蛋白质抗原的存在与否和纯度。血清免疫电泳又称为微量免疫电泳，是理想的蛋白质分离和鉴定的方法。

对流免疫电泳又称电渗析，实质上是定向加速度的免疫双扩散技术，具有微量、快速的特点，常用于医学检验。它是在琼脂板上打两排孔，左右两排分别加上抗原和相应抗体，利用电场作用，使抗原向正极迁移，而抗体在同样的电场环境中，因电渗作用向负极移动，两者在两孔之间形成沉淀线。该方法适用于定性测定。

7.2.5　补体参与的抗原-抗体反应

当抗体与细菌、红细胞等颗粒抗原结合后，可结合补体引起溶菌、溶血现象。利用这一现象设计出的补体结合试验既可检测患者血清中补体的总量，也可检测未知抗原或抗体的量。人血清中补体总量的检测对一些疾病的诊断是很重要的，如类风湿性关节炎、皮肌炎等患者血清中补体量有所升高，而活动性红斑狼疮、急性肾炎等患者血清中的补体量则会下降。

补体结合试验利用补体的参与，以绵羊红血球和溶血素为指示系统进行免疫检测。该过程涉及3种成分：指示系统、待检系统（已知抗原或抗体和未知抗体或抗原）和补体。补体通常用新鲜豚鼠血清。方法是将已知的抗原或抗体与未知标本（可能含相应抗体或抗原）充分混合，再加入补体作用一段时间，最后加入指示系统。若待检系统有相应的抗体或抗原，则能形成抗原-抗体复合物，消耗了补体而不出现溶血现象，此为阳性；相反，出现溶血则为阴性。

由于溶血的程度与补体量成正比，当50%溶血（CH50）时，其溶血度与补体量的关系最敏感，故以50%溶血度作为终点观察的指标，以测定人血清中的总补体量。本试验的影响因素较多，正式试验前需对已知成分做一系列滴定，尤其是对补体，应

选择适宜的量参与反应，避免假性结果。每次试验尚需同时设立多种对照，以作为判断结果可靠性的依据。该法对所有抗原、抗体均适用，临床上常用于检测某些病毒、立克次氏体和螺旋体感染者血清内的中和抗体，也可用于某些病毒的分型。

7.3 标记免疫分析

针对抗原-抗体反应缺乏高灵敏的定量检测信号的缺点，人们发展了在分析体系中引入探针系统——标记技术的方法，从而开创了微量和超微量分析的新天地。标记免疫分析是将已知抗体或抗原标记上易显示的物质，通过检测标记物，反映有无抗原-抗体反应，从而间接测定微量的抗原或抗体。作为一种分析技术，标记免疫分析最早建立于 1954 年。美国科学家 Yallow 和 Berson 利用放射同位素 ^{125}I 标记胰岛素，并使其与血浆中游离的胰岛素共同竞争有限的胰岛素抗体的特异性结合位点，最终形成的放射性抗原-抗体复合物与待测物含量呈线性负相关，应用 β-或 γ-计数器进行检测。这种方法称为放射免疫分析法。该方法在当时及其随后的 20 年中都是生物分析检测中最重要的成就，Yallow 由此于 1977 年获得了诺贝尔奖。

近年来标记免疫分析飞速发展，应用不同的标记物，根据不同原理、不同技术建立起来的检测方法层出不穷。常用的标记物有放射性同位素、酶、荧光素、化学发光试剂、镧系稀土元素等。与这些标记物相对应的免疫分析方法分别称为放射免疫分析法(radioimmunoassay，RIA)、酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA)、荧光免疫分析法(fluorescence immunoassay，FIA)、化学发光免疫分析法(chemiluminescent immunoassay，CLIA)和时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved fluoroisnmunoassay，TrFIA)等多种。根据抗原抗体反应后是否需要分离结合的与游离的标记抗原或标记抗体，标记免疫分析又可分为异相标记免疫分析和均相免疫分析两大类。

7.3.1 异相标记免疫分析的基本原理

异相标记免疫分析是一种需要在检测前分离游离的标记抗原或标记抗体的方法，是医学检验中常用的方法。尽管目前已发展了许多涉及异相标记免疫分析的方法，但在原理上它只主要包括两种：其一是利用标记抗原与待测抗原共同竞争有限的抗体结合位点的竞争结合免疫分析；其二是标记抗体过量的非竞争性免疫分析。这些方法均有商品化试剂盒和自动化检测仪器。

1. 竞争结合免疫分析

这一技术的基本原理是固定抗体的量，通过待测抗原与标记抗原间的竞争，获

得可测定的免疫复合物，检测信号与待测抗原浓度成反比。任何可逆的特征键合蛋白质或细胞受体均可用此法进行分析测定。其过程可用下式表示：

$$\begin{matrix}\mathrm{Ag}\\ \mathrm{Ag}^{*}\end{matrix} + \mathrm{Ab} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \begin{matrix}\mathrm{AgAb}\\ \mathrm{Ag}^{*}\mathrm{Ab}\end{matrix} \tag{7.3}$$

其中标记抗原 Ag^{*} 与抗体 Ab 的浓度或总量是固定已知的，达到平衡时与抗体结合的标记抗原 Ag^{*} 的量与样品中抗原 Ag 的量成反比。利用标准曲线法可以测出待测抗原的量。当然在检测前需分离游离的标记抗原。

2. 非竞争免疫分析

非竞争免疫分析是利用过量的标记抗体与待测抗原形成抗原-抗体免疫复合物。由于抗体过量，所有待测抗原均形成络合物，无需建立反应平衡：

$$\mathrm{Ag} + \mathrm{Ab}^{*} \longleftrightarrow \mathrm{AgAb}^{*} + \mathrm{Ab}^{*} \tag{7.4}$$

形成的复合物与 Ag 浓度成正比。最后，分离已复合的 Ab^{*} 和游离的 Ab^{*} 进行测定，这一分离方法所建立的技术又称为异相免疫测定。

7.3.2　均相免疫分析

均相法的最大特点是：结合和未结合的抗原或抗体不需物理分离过程即可直接测定，使标记免疫分析更方便地实现自动化。最常用的体系是酶放大免疫技术(enzyme multiplied immunoassay，EMIT)，它是由美国 Syva 公司研究成功并命名的。这一方法对小分子(半抗原)如药物的测定特别有用。尽管它不需分离，但也是一种竞争测定体系。用酶标记抗原后，酶保持它的生物活性。当酶标抗原与抗体反应后，酶的活性由于空间立体阻碍或构象改变而被抑制(图 7.7)。这种抑制随着游离抗原浓度的增加而减弱，因而酶的活性及其催化产物所给出的信号也就越强，利用标准曲线可测定抗原浓度。用于均相免疫分析的酶有溶菌酶

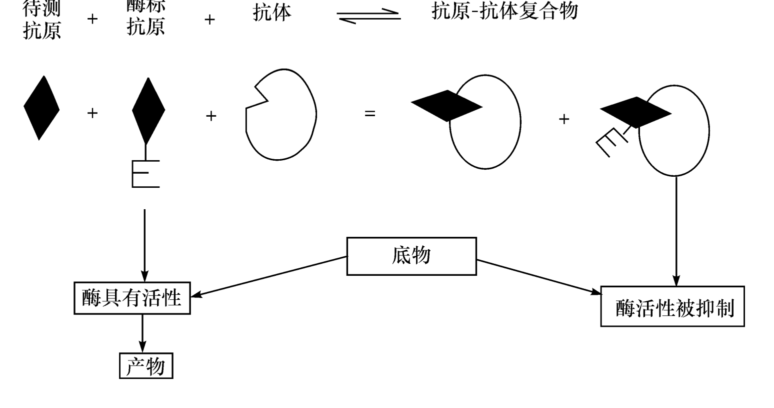


图 7.7　酶放大免疫技术检测原理示意图

(EC3.2.1.17)、苯甲酸脱氢酶(EC1.1.1.37)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC1.1.1.49)。由于可用 NADH 在 340nm 的吸光度来检测脱氢酶活性,所以它对于这一目的是特别有用的。

另一个均相免疫分析体系利用磷光偏振技术,又称荧光偏振免疫分析(fluorescence polarization immunoassay,FPIA)。荧光物质经一平面的偏振光照射后,可跃入激发态,当其释放能量回到基态时,便发出偏振荧光。荧光偏振强度与荧光物质受激发时分子转动速度成反比。分子越大,旋转越慢,发出的偏振光越强。荧光偏振免疫技术中偏振光强度的变化如图 7.8 所示。它依据荧光标记抗原和其抗原抗体结合物之间荧光偏振程度的差异,用竞争性方法直接测量溶液中小分子的含量。例如,将荧光素标记的小分子药物和待测药物一起与该小分子药物的抗体混合。若体液中待测未标记的小分子药物浓度低,则标记的药物分子与抗体结合的就多,由于抗体分子大,所形成的荧光素标记的药物分子与抗体的结合物体积亦大,旋转减慢,荧光偏振光强度就高,反之,荧光偏振光强度就低。产生的荧光偏振信号与待测物浓度成反比,通过标准曲线可以进行定量分析。

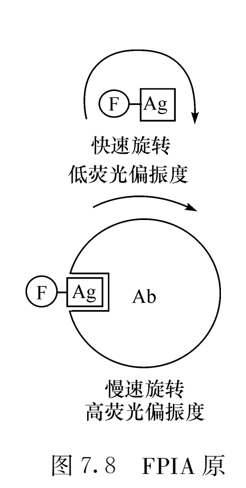


图 7.8　FPIA 原理示意图

7.3.3　放射免疫分析

如前文所述,放射免疫分析是最早建立的标记免疫分析方法,是将同位素标记技术与抗原抗体反应相结合的一种微量分析方法,广泛用于激素、药物、细胞因子、抗体、肿瘤标志物等化合物的定量分析,检测范围可达 10^{-9}～10^{-12} ng・ml^{-1},是灵敏、可靠的免疫分析方法之一,现已有 300 多种微量物质用此法测定。常用来标记抗原或抗体的同位素有^{125}I、^{131}I、^{3}H 和^{35}S。放射活性检测用液体闪烁计数,而固相体系用 X 射线胶片显影。

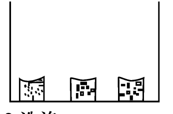
在临床上将利用放射同位素标记抗原通过竞争法原理进行测定的方法称为放射免疫分析,而将用放射性同位素标记抗体,夹心法检测的方法称为免疫放射分析(immunoradiometric assay,IRMA)。放射免疫分析的原理是用已知的标记抗原与标本中可能存在的抗原竞争一定量的已知抗体,分别形成标记的抗原抗体结合物(B)和无标记的抗原抗体结合物(F),然后将两者分离,并根据测得的放射性强度,算出结合率[B/(B+F)]。它与标本中抗原的量成反比。试验时除须做标本检测外,还要以不同浓度的已知抗原参与反应得到的数据给出竞争抑制曲线,作为定量分析的依据。

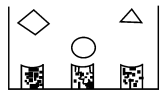
免疫放射分析是将抗体固定在管壁或载体上,待待测抗原与固定抗体反应后,倒掉反应液,生成物抗原-抗体复合物留于管底或固定相载体上,再加入标记抗体,

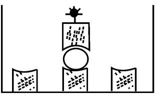
在固相上形成抗原-抗体-标记抗体的复合物，洗涤后测定放射性强度，从而推算出标本中抗原的含量。这种形成抗原-抗体-标记抗体的复合物的免疫检测方法又称为夹心法，是固相免疫法的一种，其原理如图 7.9 所示。

标记抗原的放射性同位素有：^{1}H、^{14}C、^{131}I 和 ^{125}I。H 和 C 的标记较为复杂，而 I 的标记比较简单，且 ^{131}I 和 ^{125}I 的半衰期分别是 8.05 天和 60 天，无论是用作检测还是后处理都合适，故在应用中最常用的是放射性 ^{125}I 的 γ 射线（0.035meV）。

放射性碘标记常用氯胺 T 法。氯胺 T 是氯化碳胺类氯化剂，在水中产生氯离子将 I^- 氧化为 I_2，I_2 与抗原或抗体分子上的苯丙氨酸及酪氨酸残基的苯环或组氨酸的咪唑基共价相连使之发生碘化反应。因而 ^{125}I 标记的抗原或抗体必须具有这些基团。^{3}H 因其放射性损伤小（与 β 射线相比，0.0185meV）、半衰期长（12～26 年），常被用于标记免疫分子。常用 N-琥珀酰亚胺[2,3-^{3}H]丙酸酯标记抗原或抗体分子，其活泼酯基和蛋白质的游离氨基反应。







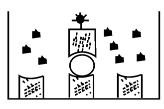


图 7.9　利用夹心法进行检测的免疫放射分析流程图

尽管放射免疫分析具有诸多优点，且易于制成配套试剂盒，实现自动化检测，并已成为颇具权威性的分析方法，但由于放射性同位素的使用带来了污物处理的难题，不仅有可能损害操作人员的健康，而且限制了“试剂”的寿命，难以获得长期稳定的检测标准。在 RIA 方法的启发下，人们陆续发展了一系列非放射性的标记免疫分析方法。

7.3.4　酶联免疫分析

1966 年，Engrall 等将抗原抗体免疫反应和酶的高催化作用相结合，用特定的酶标记抗原或抗体，并用酶催化底物的显色程度，对待测物进行定性或定量测定，建立了酶免疫分析法（enzyme immunoassay，EIA）。目前，常用的 EIA 法是酶联免疫吸附测定法（ELISA），其检测原理如图 7.10 所示。

方法之一是将抗原或抗体吸附于固相载体上，分别加入检样和酶标抗体或酶标抗原进行竞争反应，而后利用酶催化其底物显色的反应来进行检测。该方法又称直接法，可用于检测大分子抗原和小分子抗原，也可用于检测抗体，显色的深浅与标本中待测抗原或抗体量成反比。以测定抗原为例，待测样品中的抗原与酶标抗原竞争和固相抗体结合，待测抗原含量越多，能与固相抗体结合的酶标抗原就越少，显色越浅。

在检测抗体时，将抗原包被于固相载体，加入待测血清反应后，洗去未参与反应的无关蛋白质成分后，加入酶标记的抗体（如酶标抗人 IgG 作为第二抗体）或酶标记的抗原，使其与固相载体上的抗原-待测抗体复合物反应，在固相载体上形成抗原-待测抗体-酶标记抗体（或抗原-待测抗体-酶标记抗原）的复合物，加入底物后，利用显色反应进行检测，此法即为间接法。其中使用酶标记抗原的方法又称为双抗原夹心法，可避免检样中多种物质的干扰而产生的假阳性反应。

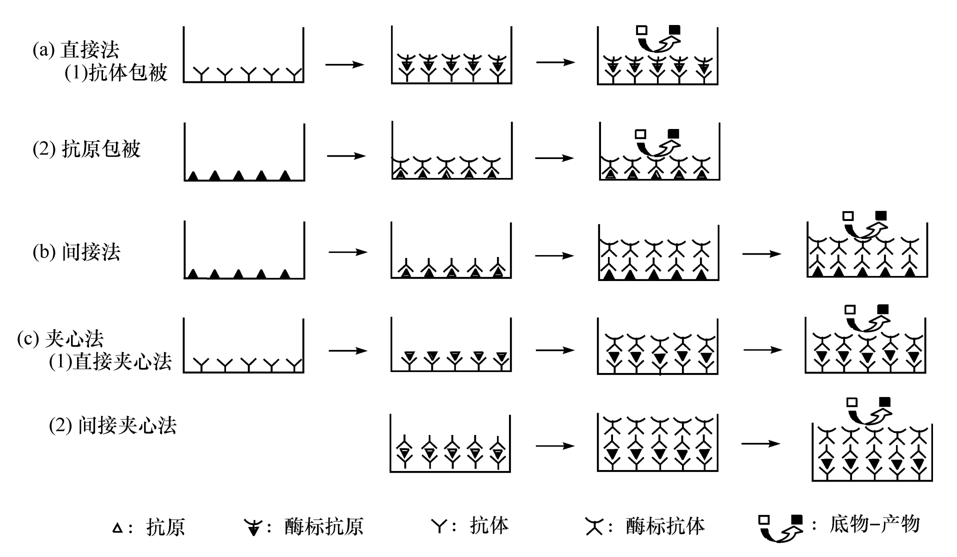


图 7.10　ELISA 的检测原理

另一种方法是抗体夹心法，它是检测抗原的常用方法，原理与 RIA 法相同，最后加入底物，利用显色反应进行检测。也可用间接法中的第二抗体进行该反应，即间接夹心法。用酶标记的第二抗体进行 ELISA，避免了用酶标另一种抗原或抗体的复杂过程，因而得到广泛应用。常用的羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG 及羊抗人 IgG 的酶结合物已经商品化，可根据需要选择合适的酶标第二抗体。该方法仅适用于两价或两价以上抗原的检测，而不适用于小分子抗原或半抗原物质的测定。

此外，血清中针对某些抗原的特异性 IgM 常和特异性 IgG 同时存在，后者会干扰 IgM 抗体的测定，这时需用 IgM 抗体捕捉法进行检测，主要用于检测各类 IgM 早期抗体。先用抗人 IgM（链）抗体包被于载体，使血清中所有 IgM（包括特异性与非特异性 IgM）均固定在固相上，经洗涤去除 IgG 后，再测定特异性 IgM。测定抗甲型肝炎病毒-IgM 通常用此法。

ELISA 中用于标记抗原或抗体的酶常有碱性磷酸酶（EC3.1.3.1，AP）、辣根过氧化物酶（EC1.11.1.7，HRP）和 β-半乳糖苷酶（EC3.2.1.23）等。它们分别与相应的底物如对硝基酚磷酸盐、邻苯二胺/过氧化氢或对硝基酚-β-半乳糖苷等生

成有色化合物，在 405nm，492nm 或 405nm 检测吸光度。此外，为了增加显色成分的稳定性，目前常用的 HRP 底物为 5,5′-四甲基联苯胺（TMB）和 2,2′-连氮基-二（3-乙基苯并噻唑）-6-磺酸盐（ABTS）。其反应式如下：

$$DH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{HRP} D + 2H_2O \tag{7.5}$$

由于酶联免疫吸附测定的仪器设备价格低廉、操作简便、酶对人和环境基本无污染，因此在免疫标记技术中，该法应用最广泛。在原有方法基础上对酶标技术加以改良，使众多新方法，如生物素-亲和素放大系统（biotin-avidin system，BAS）和双表位 ELISA 应运而生。生物素-亲和素放大系统将酶标记在生物素或亲和素上，借助生物素与亲和素的高度亲和力及生物素能与抗体结合的特点应用于 ELISA，显著提高了检测的敏感性。双表位 ELISA 方法原理与双抗体夹心法相同，但将包被的抗体和酶标抗体换成针对两个不同抗原决定簇的单抗，用于检测单抗的亲和性及表位特异性，也可用于标本中抗原的快速检测，即在试验时可将待测抗原与酶标单抗同时加入反应体系，减少检测步骤。

7.3.5　荧光免疫分析法

用荧光物质作标记物的免疫分析方法称为荧光免疫分析法（FIA）。早期的 FIA 建立于 1942 年，为 Coons 等用异硫氰荧光素标记抗体，检查小鼠组织切片中的可溶性肺炎球菌多糖抗原而创立的。当时由于此种荧光物质标记物的性能较差，未能推广使用，直至 20 世纪 50 年代末，Riggs 等合成了性能较为优良的异硫氰酸萤光黄（fluorescein isothiocyanate，FITC），并由 Marshall 等在 1958 年对标记抗体的 FIA 进行了改进，才使免疫荧光技术逐渐推广应用。

20 世纪 70 年代以来，在传统荧光抗体技术的基础上，根据放射免疫和酶联免疫测定的原理，发展和建立了各种荧光免疫测定方法，用于定量测定体液中的抗原或抗体。荧光免疫分析法是以荧光物质作为标记物，与已知的抗体（或抗原）结合但并不影响其免疫学特性。它根据荧光的存在与否来检测抗原或抗体，用于检测和鉴定未知的抗原，经与标准品对照而得到分析物的浓度。这一方法包括免疫组织化学鉴定和体液中抗原或抗体的定量测定。前者在荧光显微镜下直接观察呈现特异荧光的抗原-抗体复合物及其存在部位，称为免疫荧光定位分析（见 7.5）。这里先介绍利用荧光分光光度计进行抗原或抗体定量检测的荧光免疫分析法。它的原理与放射免疫分析法相同，即通过直接法、间接法或双抗体夹心法技术在抗原-抗体复合物与反应液分离后，用紫外线或蓝紫光激发荧光素等标记物而发射荧光进行检测。

荧光是由荧光物质的分子吸收光能后释放能量，并发出一种较长波长的光。当一束光投射到荧光物质上，其电子被激发到较高的能量水平，而后被激发的荧光

物质即释放光子而回复到初始状态。荧光物质在这个过程中丢失了一部分能量，因而释放的光子比激发光的波长更长。前后二者的波长之差是荧光物质的特征，称为“stokes 位移”。

荧光素是一种能吸收激发光的光能产生荧光，并能作为染料使用的有机化合物，也称荧光色素。适用于抗体标记的荧光素通常是环状化合物，具有共扼结构，共轭体系越大，被激发的分子稳定性越大，即荧光增强。分子平面性和硬度越大，荧光倾向较大。有些分子尤其是螯合物，加入金属离子可产生强烈荧光。目前用于标记抗体的荧光素主要有异硫氰酸荧光黄（FITC）、四乙基罗丹明（RB200）及四甲基异硫氰酸罗丹明（tetramethyl rhodamine B isothiocyanate，TRITC）。实际上应用最广的只有 FITC 一种，罗丹明常用作衬比染色或双标记。

荧光物质可在室温下使用。荧光可采用常见的、相对较便宜而无害的方法来检测。此外，结合物在一般储存条件下性能稳定，可保存使用较长时间。因此，该方法经济、安全、测定简便。但背景的干扰限制了它的灵敏度，使它无法与 RIA 相比。近年来，定量测定体液中抗原或抗体的荧光免疫分析方法随着一系列新仪器和新方法的建立，得到很大改进和发展。人们根据生物背景荧光寿命短（ns 级）的特点，提出了选择长寿命的荧光物（稀土元素——镧系元素）作为标记的时间分辨荧光免疫分析法（TrFIA）[12]，使免疫荧光分析技术的标准化、定量化和自动化进入了一个新的发展阶段。

时间分辨荧光免疫测定是 20 世纪 80 年代初期在免疫荧光分析的基础上发展建立的一种新型免疫分析技术。其原理和方法与一般免疫荧光法不同，所用示踪剂不是荧光素，而是采用镧系元素如铕离子（Eu^{3+}）或铽离子（Tb^{3+}）等的配合物等标记抗体或抗原，并利用时间分辨荧光计测量法排除样品中非特异荧光的干扰，最大限度地提高了测定方法的灵敏度。这种方法利用一种门控技术，使背景荧光信号降低到零以后，再测定长寿命标记物的荧光（图 7.11）。它将 FIA 的灵敏度提高了几个数量级，可达 10^{-17} mol · L^{-1}，明显提高了荧光免疫分析的特异性。TrFIA 法在灵敏度、特异性、稳定性及测量自动化程度等方面都可与放射免疫测定相媲美，而且其标准曲线范围宽（跨越 4～5 个数量级），最小检出值可达 10^{-18} mol · L^{-1}，分析速度快，远远超过 RIA、EM 及发光免疫测定，并具

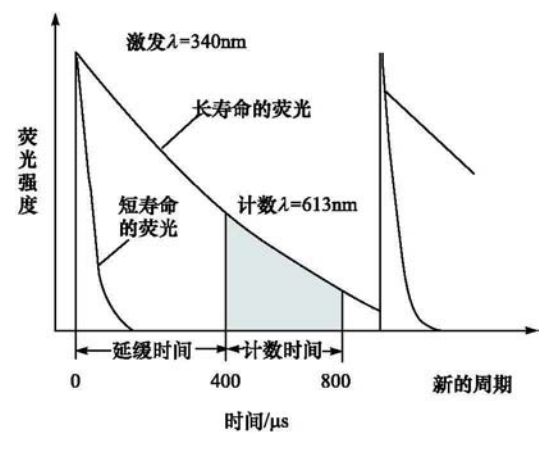


图 7.11 时间分辨荧光测定的原理示意图

有结合物制备较简便、有效使用期长、无放射性污染、应用范围广等优点。因此TrFIA法问世时间虽短，发展却十分迅速，成为目前超微量物质免疫分析中最有发展前途的一项技术。

镧系元素如铕离子(Eu^{3+})或铽离子(Tb^{3+})等配合物的荧光寿命为10～10 000μs，比蛋白质等的背景荧光长10^4倍。Eu^{3+}不能直接标记在抗原、抗体分子上，而是用具有"双功能"基团的金属配体"桥"连于蛋白质分子上。常用的双功能配体有β-二酮衍生物、EDTA衍生物、水杨酸衍生物等。Eu^{3+}等稀土元素配合物作为标记物的最主要特点是：①激发光谱带宽(300～380nm)，有利于增高激发能，提高标记抗体的灵敏度；②发射光波长宽(613nm)，有利于降低背景，利用干涉滤片可排除散射荧光的干扰，提高分辨率；③Stockes位移大(200～300nm)，有利于排除非特异荧光的干扰；④稳定，可保存1～2年；⑤激发光随配体变化而变化，而发射光只具有镧系元素的性质，有利于各种稀土离子标记进行多分析物同时检测。

TrFIA的测定原理与通常的荧光免疫分析基本相同，只是标记物和信号的测量不同。当Eu^{3+}离子配合物标记抗原后，通过竞争反应，分离出免疫复合物，利用时间分辨荧光仪测定Eu^{3+}离子发射的荧光强度，即可确定待测抗原的量。将稀土离子通过螯合剂与抗体分子上的游离氨基酸共价结合，可建立双抗体夹心时间分辨免疫荧光方法(time-resolved immunofluorometric assay，TRIFMA)检测抗原。在正常情况下，免疫复合物中的稀土离子自身的荧光信号较弱。加入酸性增强液后，稀土离子从免疫复合物中解离出来，与增强液中的β-二酮体、三辛基氧化膦或Triton X-100等重新形成一种微胶体化合物。其中的Eu^{3+}在340nm光激发下，可发出长寿命的高强荧光(613nm)(图7.12)，强度增加10^6倍，可用时间分辨荧光仪记录下来进行分析检测。这类分析方法又称为解离-增强时间分辨荧光免疫分析

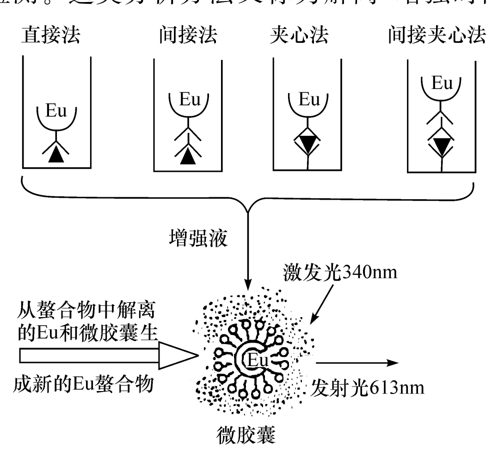


图7.12　时间分辨荧光免疫分析原理示意图

法(dissociation enhanced lanthanide fluoroimmunoassay,DELFIA)。

7.3.6 化学发光免疫分析

酶免疫分析法克服了 RIA 中放射性污染的弊病,具有灵敏度高、设备简单、操作安全等优点,但同时也存在酶不稳定、光度测量范围窄等不足之处。随免疫测定应用的日新月异,分析方法及相关技术的发展,20 世纪 70 年代末,Halmann 和 Velan 建立了化学发光免疫分析(CLIA),是发光分析的一种。所谓发光免疫分析,是以发光物质为标记物,通过偶联反应,使标记物分子中的反应基团直接连接在标记免疫分子上。其检测原理与以上方法相类似。化学发光免疫分析既具有免疫反应的特异性,又兼有发光反应的高敏感性,因此满足了快速、简单、稳定、灵敏、特异和准确等要求。其最小检出限可达 10^{-12}～10^{-15} mol。

化学发光免疫分析以化学发光反应为基础。在常温下,一些特定的化学反应产生的能量使其产物或反应中间态分子激发,形成电子激发态分子,当其衰退至基态时,所释放出的化学能量以可见光的形式发射,这种现象称为化学发光(CL),能产生 CL 反应的物质称为化学发光剂或化学发光底物。化学发光试剂常用吖啶酯、鲁米诺(luminol)及其衍生物,反应时发光剂发生高能化学反应,形成处于激发态的分子,当这些产物分子回到基态时,伴随着光子的释放发生化学发光现象。CL 反应绝大多数属于氧化反应,因为该反应能提供足够的能量使其产物分子或反应中间态分子上升至电子激发态。目前应用在免疫测定中的重要化学发光反应有以下几类:

(1) 氨基苯二酰肼类参加的 CL 反应:主要是鲁米诺及异鲁米诺衍生物。它们在催化剂(如过氧化物酶,POD 或 HRP)的参与下被过氧化氢氧化而产生化学发光。发射光的波长为 375～550nm,以 425nm 波长为主。

(2) 吖啶酯参加的 CL 反应:这类化学发光剂不需要催化剂的参与,在过氧化氢的稀碱溶液中即能发光。发射光的波长为 430nm。

(3) 碱性磷酸酶(AP)参与的 CL 反应:化学发光剂为金刚烷基(adamantyl)1,2-二氧杂环丁基磷酸酯,在碱性磷酸酶的作用下能分解成不稳定的二氧杂环丁烷(dioxetane)底物而发光。

(4) 生物发光:常见的反应体系为虫荧素,在虫荧酶的催化下,有 ATP、Mg^{2+} 及 O_2 存在时,发生瞬时发光反应:

$$LH_2(\text{虫荧素}) + ATP + Mg^{2+} \xrightarrow{\text{虫荧酶}} LHAMP^+ \tag{7.6}$$

$$LHAMP^+ + O_2 \longrightarrow L(\text{氯化虫荧素}) + CO_2 + AMP + h\nu \tag{7.7}$$

化学发光免疫分析采用单克隆抗体试剂,大分子物质采用夹心法分析,小分子物质采用竞争法或抗体捕获法进行分析。二氧杂环丁基(dioxetane)磷酸酯作为

碱性磷酸酶的底物，是灵敏、稳定的发光剂。其连续稳定的发光、极广泛的线性范围，彻底改变了传统发光标记物不可避免的发光不稳定、在反应过程发生裂变导致结果不稳定等缺陷，使化学发光由理想状态变为现实。

传统的化学发光免疫分析技术常用聚苯乙烯作为固相载体，目前使用磁性微粒作为固相载体。微粒子磁性铁珠的粒径为 7μm，用它为固相载体包被抗体或抗原是因为：它表面积大，测定中所需标本量极少，可使温育时间缩减、测定时间减少，且可降低交叉污染概率。

7.3.7　电化学发光免疫分析

在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应，称为电化学发光（electro chemi luminesence，ECL）。将电化学发光与发光免疫分析结合起来就构成电化学发光免疫分析法（electrochemi luminescent immunoassay，ECLIA）。它包括免疫反应、电化学反应和发光反应三个过程。免疫反应及其相应分析技术与前面介绍的内容相同。电化学反应和发光反应同时进行，简称电化学发光反应。标记抗体或抗原所用的发光剂通常为三联吡啶钌（$[Ru(bpy)_3]^{2+}$），它与电子供体三丙胺（TPA）在阳极表面同时各失去一个电子发生氧化反应，生成$[Ru(bpy)_3]^{3+}$和TPA^{+*}自由基。$[Ru(bpy)_3]^{3+}$是强氧化剂，TPA^{+*}失去一个质子后变成强还原剂 TPA^{*}。TPA^{*}在电极表面迅速还原$[Ru(bpy)_3]^{3+}$生成激发态的三联吡啶钌$[Ru(bpy)_3]^{2+*}$，其能量来源于$[Ru(bpy)_3]^{3+}$和 TPA^{*}之间的高电化学电位差。激发态的三联吡啶钌$[Ru(bpy)_3]^{2+*}$发射一个波长 620nm 的光子。

$$
\begin{aligned}
&[Ru(bpy)_3]^{2+} - e \longrightarrow [Ru(bpy)_3]^{3+} \\
&TPA - e \longrightarrow TPA^{+*} \\
&TPA^{+*} \longrightarrow TPA^{*} + H^{+} \\
&[Ru(bpy)_3]^{3+} + TPA^{*} \longrightarrow TPA + [Ru(bpy)_3]^{2+*} \\
&[Ru(bpy)_3]^{2+*} \longrightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu
\end{aligned}
\tag{7.8}
$$

这一过程在电极表面可周而复始地进行，产生许多光子，使信号加强。

7.4　免疫组织化学与免疫印迹技术

利用抗原-抗体间的特异反应，通过标记抗体，可现场观察组织切片或细胞样品中抗原的种类与位置，这就是免疫定位分析。这种方法将免疫反应的特异性和灵敏度与显微镜的精密度结合起来，能比较快速地测出少量抗原或抗体在细胞内或组织内的定位及分布，因此可用于免疫细胞化学和免疫组织化学的检测，对某些生物功能分子在细胞或组织中的表达和定位是非常有效的方法之一，在临床医学、病毒学、免疫学以及生物学基础理论的研究中也日益得到广泛的应用。

免疫定位分析的基本原理由图 7.13 所示。常用的标记方法有荧光染料、酶和胶体金或银纳米粒子。相应的检测方法分别为免疫荧光分析(或称为荧光抗体技术)、免疫酶染法和胶体金技术。前者用荧光显微镜,后两者用电子显微镜进行观察与测量。检测时,样品在与标记抗体反应后常需彻底冲洗以免非特异性反应干扰观测。

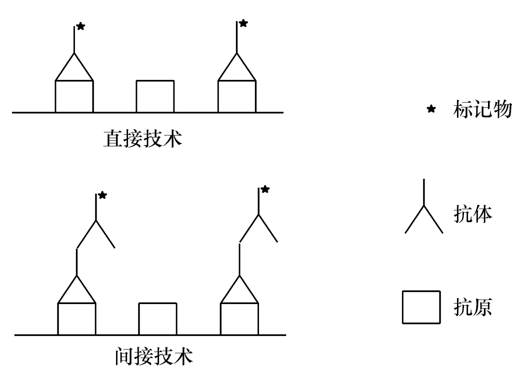


图 7.13　免疫定位分析的一些技术

7.4.1　免疫荧光分析

该方法将荧光素(异硫氰荧光素或异硫氰四甲基罗丹明,600nm,深红色)等荧光色素用双功能交联剂标记在抗体的 Fc 片段,这一过程不影响抗体与细胞或组织中抗原的特异性结合,标记的抗体可直接与组织切片或细胞中的抗原结合,经反应和洗涤后在荧光显微镜下进行观测。标本中如有相应抗原存在,即能与荧光抗体特异结合,在显微镜下可见有荧光的抗原-抗体复合物。这一方法称为直接法。此法的优点是简单、特异,缺点是检查每种抗原均需制备相应的特异性荧光抗体,且敏感性低于间接法。常用于细菌、病毒等的快速检查和淋巴细胞表面抗原与受体的鉴定。

间接法是根据抗球蛋白试验的原理,用荧光物质标记抗球蛋白抗体(第二抗体或抗抗体,一般是抗人 IgG,简称标记抗抗体)。检测过程分为两步:第一步,将待测抗体(第一抗体)加在含有已知抗原的标本片上,作用后,洗去未结合的抗体。第二步,滴加标记抗抗体。如果第一步中的抗原抗体已发生结合,此时加入的标记抗抗体就和已固定在抗原上的抗体(一抗)分子结合,形成抗原-抗体-标记抗抗体复合物,并显示特异荧光。此法的优点是敏感性高于直接法,而且只需制备一种荧光物质标记的抗球蛋白抗体,就可用于检测同种动物的多种抗原抗体系统。也可用荧光物质标记葡萄球菌 A 蛋白,代替标识抗球蛋白抗体用于间接法荧光染色,且不受第一抗体来源的种属限制,但敏感性低于标记抗抗体法。间接法的缺点是有时易产生非特异性荧光。此法常用于各种自身抗体的检测。如果第一抗体为已知抗体,间接法也可用于鉴定未知抗原。

另一种方法是补体法，是间接法的一种改良，它利用补体结合反应的原理，即在抗原抗体反应时加入补体(多用豚鼠补体)，再用荧光物质标记的抗补体抗体进行示踪。检测过程先将待测抗体和补体加在已知抗原标本片上，作用后洗去未结合的抗体和补体，然后滴加荧光物质标记的抗补体抗体。如果在第一步中抗原抗体发生特异性结合，则补体被固定，此时加入的标记抗补体抗体即与补体发生结合，形成抗原-抗体-补体-标记抗补体抗体的大分子免疫复合物。此法的主要优点是只需制备一种荧光物质标记的抗补体抗体，即可用于检测各种能固定补体的抗原抗体系统，不受抗体来源的动物种属限制，敏感性也较高。但其缺点是容易出现非特异性染色，而且操作过程较复杂。

利用两种以上的荧光染料(如 FITC 和 TRITC)分别标记所需的特异性抗体，可同时定位同一标本内的不同抗原。此法主要用于细胞表面抗原和受体的研究及某些疾病的诊断。例如用荧光抗体鉴别淋巴细胞亚群，尤其是 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞亚群，在临床上具有重要的意义。结合流式细胞仪而发展的工具为荧光激活细胞分拣器，可将不同细胞群分离。

7.4.2　免疫酶技术

免疫酶技术是利用抗原抗体反应的特异性和酶促反应的放大作用，灵敏地检测组织细胞中抗原的定位和分布的一种方法。最早应用的免疫酶技术是免疫酶组织化学染色，即用酶标抗体与标本中的抗原进行特异反应。当加入酶的底物时，在酶的作用下经一系列反应产生不溶于水的有色产物，借助显微镜进行定位判断。通常利用辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)或葡萄糖氧化酶(GOD)来标记抗体。辣根过氧化物酶酶促反应的第一步需要特异的底物——过氧化氢，以后的反应是非特异的，可用各种电子供体介导产生不同的颜色，如联苯二胺(DAB，棕色)、氨基乙基卡巴胺(AEC，淡红色)、四甲基联苯(TMB，蓝黑色)等。AP 的常用底物有 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸/氮蓝四唑(BCIP/NBP，蓝紫色)和磷酸萘酚 AS/快红 TR(红色)等，而 GOD 的底物为硝基蓝四氮唑/联苯甲砜(蓝紫色)。通过显微镜观测有色沉淀即可判断细胞与组织切片内抗原的存在及其位置。

利用共价键合方式偶联酶与抗原或抗体难免会丧失部分抗原、抗体和酶的活性，为了避免抗体的标记步骤，提出了非标记抗体酶法，即酶桥法和过氧化物酶抗过氧化物酶法。酶桥法是利用第二抗体将与组织抗原结合的第一抗体和抗酶抗体结合在一起。第二抗体是作为桥将两种第一抗体连结起来，这就要求 HRP 抗体和组织抗原抗体都为相同种属动物的 IgG。过氧化物酶抗过氧化物酶法(peroxidase-antipero xidaze technique，PAP)是在检测时加入第二抗体后，再加 HRP 和抗 HRP 的复合物，如图 7.14 所示。PAP 复合物含有 3 个 HRP 分子，因此该法灵敏度比酶标抗体法高 20～25 倍。

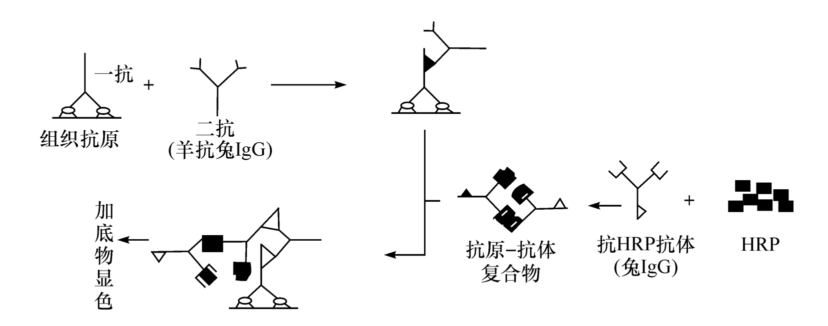


图 7.14　过氧化物酶抗过氧化物酶染色法示意图

7.4.3　滴金免疫分析

滴金免疫分析又称为免疫金技术，是在 1971 年由 Faulk 等提出并应用于免疫组化研究的。1974 年 Romano 等在抗抗体上标记胶体金，建立了间接免疫金染色法。所谓胶体金，是指在分散介质中存在的由 1～100nm 大小的金颗粒所形成的分散体系，即胶体溶液。它可利用还原剂乙醇、过氧化氢、白磷、硼氢化钠、抗坏血酸、柠檬酸三钠等还原氯金酸（$HAuCl_4$）制成。胶体金颗粒的大小的控制是通过对还原剂用量的控制来实现的，还原剂用量愈大，颗粒愈小。金颗粒吸附抗原或抗体后即形成胶体金标记的抗原或抗体，用于免疫印迹、免疫组织化学定位或快速免疫渗滤（滴金免疫）试验。这一方法既可在光学显微镜下观测，也可在电子显微镜下观测。后者又称为免疫电子显微镜技术（immuno-electron microscopy，IEM），它大大提高了电镜观察的特异性。

胶体金技术的制备和操作都很简便，无需特殊设备，显色底物无致癌作用，且染色结果可以长期保存。可应用大小不同的金颗粒标记不同的特异性抗体，同时可以定位两种以上的组分或抗原决定簇在细胞内的分布。根据颗粒多少还可以对特异性抗原成分的强度进行估计。在用作细胞内抗原定位时，由于直径大于 10nm 的金粒子不易穿透组织，故用 5nm 金胶为宜。目前流行于市面的人绒（毛）膜促性腺激素（humanchorionic gonadotropin，HCG）早孕检测试纸，就是利用免疫胶体金显示的，灵敏度可达 $50mIU \cdot ml^{-1}$。

胶体金标记抗原/抗体的机制尚不清楚。一种说法是认为胶体金表面带有正电荷，而蛋白质在略大于其等电点的偏碱条件下带负电荷，正负电荷相互的静电吸引将抗体分子吸附于胶体金颗粒表面。

为了提高免疫金技术的可见度和精确度，1981 年 Danscher 发展了免疫金银染色法（immunogold silver staining，IGSS）。这种方法进一步将沉积的金颗粒进行银染色液处理，这时金作为一种催化剂，经还原剂（如对苯二酚）处理，将显影剂中的银离子还原成不溶性金属银，沉淀在每个金颗粒周围，使抗原位置得到放大，

可用光镜观察。它具有分辨率高、定位精确等优点，易用于细胞表面标志定位、免疫细胞亚群计数和白细胞分型等。

7.4.4　免疫印迹分析

利用酶标抗体，以微孔膜（如硝酸纤维素膜、尼龙膜等）代替聚苯乙烯板作载体，将包被有抗原或抗体的微孔滤膜贴置于吸水材料上，依次滴加标本、酶标记物、底物，分别进行洗涤，使多余的标本和酶标识物及洗涤液等可渗滤入吸水材料中，最后阳性标本在膜上呈现着色斑点，通过上述免疫组织化学的方法观测抗原，可对体外可溶性蛋白质抗原的存在进行鉴定，这一分析方法称为免疫印迹或斑点免疫渗滤试验（dotimmunogold filtration assay，DIFA）。

一个改进的方法是 Western 印迹法（图 7.15）或酶联免疫电转移印迹法。它是将可溶性的蛋白质抗原先用 SDS-PAGE 电泳分离后，使不同分子质量的蛋白质在 PAGE 上形成不同区带（肉眼不可见），将这些条带转移至硝酸纤维素膜上，用固定在硝酸纤维素膜上的蛋白质用特异性抗体和酶标抗抗体作间接 ELISA，结果使阳性区带呈显色反应，进行定位分析。

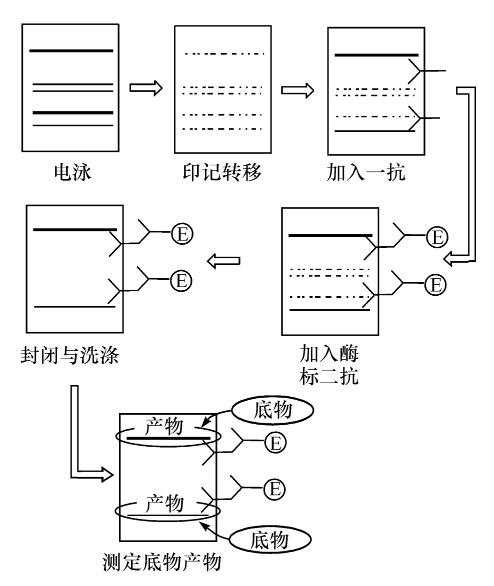


图 7.15　免疫印迹技术原理图

免疫印迹分析中标记抗体所用的酶及相应底物与免疫组织化学中的相同。将免疫转印技术与酶标技术相结合，有利于分析和检测更加复杂的抗原成分。此外还可用同位素标记进行免疫印迹分析。

7.5　免疫分析的发展与新技术

免疫分析已发展成为一个跨学科的新型分析技术，广泛应用于临床体液分析、药物分析、环境分析、食品分析和生物化学研究，尤其在毒品的鉴定、吸毒人员的认定、疾病的诊断诸方面，发挥了重要作用，其发展可说是方兴未艾。促进其发展的关键因素之一是抗体制备技术的改进。从被免疫的动物血清中获得的抗体是多克隆抗体，虽然用于免疫分析可提高特异性，但缺点是抗体不均一、来源是间断的、有较大的批间差别。20 世纪 70 年代以来发展的单克隆抗体（简称单抗）技术，克服了多克隆抗体的这些缺点，被称为免疫学上的一次革命，也是人类第一次获得了能按照人的意志在体外产生抗体的杂交瘤细胞。与多克隆抗体相比，单抗具有许多优点，如与抗原决定簇结合的高度特异性和均一性、产量高、可连续大量生产等。目前，单抗在医学上获得了广泛的应用，可用作诊断试剂，用于各种病原体和肿瘤的诊断、分型及定位，也可以作为研究抗原物质结构与功能关系及研究免疫分子的探针等。

随着分子遗传学、生物化学，特别是分子生物学的发展，人们开始利用 DNA 分子重组技术来改造和生产所需要的特异性抗体，称为基因工程抗体，使人们从分子水平设计和改造抗体成为可能。例如，双特异性单克隆抗体就是通过两个不同的单抗细胞系的二次融合和抗体筛选得到的。它是具有两个抗原结合位点的抗体，也即可以识别两种不同的抗原决定簇。双特异性抗体的一个 Fab 端结合待测抗原，另一 Fab 端则可结合标记物，显示了它的优点：省略了标记的过程，操作简化并缩短了检测时间，易于标准化，尤其适合于大批量样品的检测。又如嵌合抗体，是指用 DNA 重组技术对小鼠抗体基因进行改造，生产出的天然不存在的人造抗体。再如抗体酶，又称催化抗体，是指既能与抗原发生特异性结合，又具有催化功能的抗体分子，它的成熟和应用必将促进免疫分析向简便、灵敏、特异方向发展。这里介绍几种在临床尚未普及而又具很好应用前景的方法。

7.5.1　多组分免疫分析

多组分免疫分析（multianalyte immunoassay，MIA），是一种用同一份样品同时测定两种或两种以上物质的免疫分析方法，是新近发展起来的并且能引起人们兴趣和关注的分析新技术。由于抗体的特异性，一种抗体一般只能检测一种抗原，当进行多组分分析时，就得同时使用多种抗体。多组分免疫分析技术现在有两种设计方式。

1. 多探针标记法

它基于用不同标记物对多种抗原或半抗原标记，用竞争法测定各物质的量。对探针的要求是要有相容的分析条件和显著的信号差别，以使其互不干扰。由于进行同时检测，几种标记物的测定条件必须相互妥协，故测定灵敏度和组分数均受到限制，因此适合于同时检测的标记物体系甚少，通常实施的是双探针标记分析。例如以^{125}I和^{131}I标记，多道闪烁计数仪检测，同时测定三碘甲状腺素和甲状腺素；用 Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 的二乙三氨五乙酸的配合物标记小分子药物——苯巴比妥和苯妥因，用二抗包被，通过竞争法对苯妥因和苯巴比妥进行同时测定，其灵敏度分别可达 $50ng \cdot ml^{-1}$ 和 $20ng \cdot ml^{-1}$。

2. 多组分定位包被空间分辨分析法

利用空间的不同位置标记同种标记物来测定，在不同的固相体系或同一固相载体上的不同反应区带上包被不同抗体，用于固相免疫同时测定。该法虽只用一个标识物，但需要一个能分步或同时检测各反应区带的检测系统，通过扫描测定可完成理论上任意组分的同时分析。因此，该法在定位包被和检测技术上有一定的难度。目前，该法已取得了相当的成功，例如 Kakabakos 等[13]用该法包被抗体，通过夹心法激光激发 Eu^{3+}，用时间分辨荧光免疫分析法同时测定了血清中的促黄体素、促滤胞素、人促绒毛性腺激素和促乳素。该法在药物滥用检测中得到了应用，据报道可同时测定可卡因、吗啡、巴比妥、安非他命等 7 种药物。

7.5.2　脂质体免疫分析

脂质体是一种生物模拟膜，它是由磷脂分子分散于水相中形成的密闭双分子单层或多层的囊泡。脂质体的膜结构决定了脂质体的性质与功能。磷脂或混合类脂都可以形成脂质体，不同的脂成分及不同的制备方法与外界条件下所形成的脂质体的膜结构不同，相应的脂质体大小、通透性和稳定性均有所区别。人们正是利用脂质体膜结构的相对稳定性和随条件的变化规律，将其广泛应用于各个领域。

作为一门新兴的生物技术，脂质体已作为药物载体实现了靶向给药，获得了人们的重视。它目前已用作细胞膜的人工模型、遗传物质的载体、免疫佐剂等。基于脂质体在形成过程中能包裹水及其中的溶质分子，具有很高的信号放大作用，且脂质体表面还可以连接抗原或抗体等生物大分子，膜表面抗原-抗体复合物可激活补体，从而导致脂质体的溶解，释放出的标记物量与膜表面的抗原-抗体复合物的量成正比，据此，建立了脂质体免疫分析法（liposome immunoassay，LIA）。它独特的高灵敏度、均相、快速的特点引起了人们的广泛关注。

脂质体免疫分析用于测定地高辛，检测限为 $0.04\mu g \cdot ml^{-1}$。Pagni 等[14]用脂

质体免疫乳胶凝集法测定了人血清中的铁蛋白，检测限为 $4ng \cdot ml^{-1}$。Lim 等[15]通过磷脂酶 C 具有催化水解生物膜中磷脂的作用，利用内部包裹钙黄绿素的脂质体，检测由脂质体溶解后泄漏出的钙黄绿素，测定了磷脂酶 C。Yashio 等[16]以该法测定了癌胚抗原(carcinoembryonic antigen，CEA)。免疫脂质体分析法检测大肠癌抗原的过程是首先将制备好的包裹有羧基荧光素的脂质体通过双功能试剂与大肠癌抗体偶联，得到标记有大肠癌单克隆抗体的免疫脂质体，通过补体介导的均相 LIA 法检测大肠癌抗原，线性范围 $1.2pg \cdot ml^{-1}$～$23ng \cdot ml^{-1}$，比 ELISA 法的灵敏度提高了两个数量级。

LIA 是一类处于起步阶段的独特的非放射免疫分析方法，既可均相操作，也可非均相操作，目前已形成多种测定模式。尤其是它的信号放大作用及很高的灵敏度，促进了人们深入研究的兴趣。但是，脂质体的不稳定性已成为该法实用化的最大障碍。此外，磷脂易氧化降解，非特异性溶解等问题需要进一步研究。

7.5.3　控温相分离免疫分析

分离问题直接关系到免疫分析的准确度和灵敏度。近年来，医学界加强了对药物在体内作用规律的研究，依据个体患者的体液药物浓度监测来指导合理用药，以求达到安全有效的治疗。建立一个体液药物浓度测定方法十分困难，主要原因是体液(血清)中药物浓度低、干扰多、测定结果差异大。如血浆中雄二醇含量对于诊断妇科疾病及内分泌系统疾病有很高的价值，但人血清中雌二醇含量在皮克级(10～$30pg \cdot ml^{-1}$)，非放射性免疫分析方法至今难以企及，因此，对分离方法的研究已成为免疫分析走向成熟的关键之一。现有的分离方法大多费时，操作烦琐或成本较高。

智能型水凝胶，如 N-异丙基丙烯酚胺(NIPAAm)和甲基乙烯基醚(MVE)等，在水中能极大地溶胀而不溶于水，以亲水性和水不溶性为特征，是可以吸收水的三维聚合物网络，在水中溶胀至平衡体积后可保持一定形状，小分子可以通过扩散透过水凝胶。水凝胶的性质不仅取决于单体、交联剂及聚合的工艺条件，而且还与溶胀条件有关，随着外界环境的不同而变化，水溶性聚合物及其透过轻度交联而形成的水凝胶会产生各种各样的响应，根据不同刺激的响应，又分 pH 敏感性、热敏性、光敏性、盐敏性等。其中，温度敏感性水凝胶引起了人们的兴趣。它具有随温度变化而发生溶解和溶胀状态突变的特殊性质，存在一个“临界析相温度”(lower critical solution temperature，LCST)。在低温下它是水溶性的，温度升高至接近或高于 LCST 时，就会沉淀出来，通过离心进行分离。当温度降至低于 LCST 时，聚合物又会重新溶解，变为柔软透明的溶胀状态。据此，在低于 LCST 时，体系呈液相状态，抗体或抗原与聚 N-异丙基丙烯酚胺(p-NIPAAm)偶联后，可以快速发生免疫反应，然后将体系温度升高超过 LCST，利用高速离心，将高聚物-抗原-抗体复

合物与杂蛋白、未反应的抗原抗体及标记物分离,分离简便、省时。这一方法称为控温相分离免疫分析,又称沉淀免疫分析(temperature-controlled phase-separation immunoassy,TCPSIA)。

温度敏感高分子水凝胶的应用很多,Hoffman 等[17]于 1987 年最先报道了其在免疫分析上的应用,但至今没有引起人们的足够重视。Liu 等[18]将抗体与 p-NIPAAm共价结合,再固定于纤维素膜上,建立了聚合物酶联免疫分析法和聚合物免疫印迹法,对人体血清中的乙肝表面抗原进行了测定,灵敏度分别为 10^{-10} g · ml^{-1} 和 10^{-9} g · ml^{-1}。在用异硫氰基荧光素标记苯妥因方面,常文保等[19]建立了测定苯妥因的免疫分析新方法,可检测 5ng · ml^{-1} 的苯妥因,与均相方法相比,灵敏度有很大提高,测定可在 30min 内完成,基本上达到了临床检测的要求。

由于 p-NIPAAm 胶能感知、处理并响应外界环境的细微变化,因此有良好的应用前景。它可以应用于药物的控制释放、酶的固定化、溶质的分离和物质的纯化等诸多方面。目前看来,该方法尚有不足之处:一是测定中本底较高,对灵敏度的提高有一定的影响;二是功能水凝胶特异性配基的稳定性问题。

7.5.4　与电化学方法的联用

目前,临床上普遍采用的酶联免疫吸附试验均是利用酶催化其底物显色反应来进行检测的。事实上这些酶催化反应产物大都具有电化学活性,同样可以用电化学方法进行检测,从而发展了酶联免疫电化学分析方法。由于电化学方法的灵敏度高,响应信号的变化范围比吸光度范围宽,所以该方法具有比通常的 ELISA 法更高的灵敏度和更宽的线性范围,利用示差脉冲酶联免疫测定甲胎蛋白的检测限达 0.06ng · ml^{-1}[20]。同样,酶联免疫电化学分析方法有:①可将抗原或抗体吸附于固相载体上,分别加入检样和酶结合物反应物,竞争反应后通过测定酶催化其底物反应的产物来进行检测。②用酶标二抗体或抗原与待测抗体反应,在固相载体上形成抗原-待测抗体-酶标记抗体(或抗原-待测抗体-酶标记抗原)的复合物,加入底物后,测定酶催化反应的产物进行检测。③利用抗体夹心法进行。可用于酶联免疫电化学分析的标记酶通常为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和葡萄糖氧化酶等。

另一种常用的与电化学方法联用的技术是免疫电化学传感器,包括以下几种方法:①将抗原或抗体固定于电极表面,电极在待测抗体或抗原溶液中温育后,再与酶标二抗或酶标抗体结合,将酶固定至电极表面,然后在酶底物溶液中进行电化学检测,其信号与固定至电极表面的酶量即待测抗体或抗原的量成正比。该方法很容易发展成免疫芯片,避免了洗板步骤,方便、灵敏。②将抗原或抗体固定于电极表面后,利用竞争法,即在含待测抗体或抗原与酶标抗体或酶标抗原中温育,然

后在酶底物溶液中进行电化学检测。③将酶标抗体(原)固定在电极表面,溶液中底物在电极上产生电化学信号(电流),当酶标抗体(原)与溶液中待测抗原(体)反应时引起电化学信号的变化,这种变化与待测抗体或抗原的量有正比关系。这类方法不需分离和竞争过程,因而具有更快的检测速度。④将酶底物固定在电极表面,结合 ELISA 方法,最后无需在溶液中加底物,可直接进行测定。免疫电化学传感器的最显著的特点是它可进一步微型化,利用芯片技术可获得微型多功能的安培免疫器件。

7.6 印迹技术

分子识别和专一性结合是整个生物学普遍存在的特有现象,多发生于不同的生物分子之间,如抗原与抗体、蛋白质类激素、植物凝集素、外源凝集素或药物与受体、蛋白酶与蛋白质底物、蛋白质与核酸之间的高度特异性反应就是天然的分子识别过程,在生物进化中起着特殊而重要的作用。分子识别引导着所有生理过程中大分子间的选择性相互作用,广泛地存在于生物体系中,是从分子水平研究生物现象的重要化学手段。但是,现有的生物分子识别系统都是建立在一些脆弱的生物活性物质基础上(如抗体、补体、酶、核酸等),这些生物活性物质易失活,缺乏保存和操作的稳定性,并且在制备和纯化等方面条件苛刻,极大地限制了它们在实际中的应用。为获得分子识别过程中的高选择性结合位点,科学家们利用一些天然化合物,如冠醚、环糊精,环芳烃等具有类似生命分子功能的人工受体来模拟生物体系进行分子识别的研究,并取得了可喜的进展,在一定意义上构成了分子印迹技术的雏形。因此,进行仿生分子识别研究,开发其在生命科学、材料科学和化学等领域的基础应用研究,在仿生领域具有非常重要的意义。

近年来出现的分子印迹技术(molecular imprinting technique,MIT)为实现仿生分子识别提供了诱人的契机。分子印迹的出现直接源于免疫学的发展,早在 20 世纪 40 年代,著名的诺贝尔奖获得者 Pauling[21] 就提出了以抗原为模板来合成抗体的理论,为分子印迹的发展奠定了理论基础,同时也激发了人们以抗原为模板进行分子自组装合成抗体模拟物。1972 年,德国的 Wulff[22] 研究小组首次成功制备出分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer,MIP),使这方面的研究产生了突破性进展,也使这项技术逐步为人们所认识。1993 年,Mosbach 等[23] 在“*Nature*”上发表了有关茶碱分子印迹聚合物及其仿生免疫分析应用的文章后,这一技术更为迅猛地发展起来,在化学仿生传感器、抗体模拟酶、人工酶催化剂、药物手性分离、药物控制释放、药物筛选等诸多领域,显示出诱人的应用前景,并由此成为化学和生物学交叉的新兴领域之一,是目前国际研究的热点课题。

7.6.1　分子印迹技术的基本概念与原理

分子印迹(molecular imprinting,MI)是制备对某一化合物具有选择性的聚合物的过程。该化合物叫印迹分子(pint molecule,P)或模板分子(template molecule,T)。分子印迹技术是指为获得在空间和结合位点(binding site)上与某一分子(模板分子、印迹分子)完全匹配的聚合物的制备技术。实现分子印迹通常包括3个过程:①选定印迹分子和功能单体(functional monomer),使二者在一定条件下发生互补反应,形成某种可逆印迹分子-单体复合物(host-guest complex);②加入交联剂(cross linker)使这种复合物“冻结”起来,制得高聚物;③用化学或物理方法将印迹分子从聚合物中脱除(removal)。于是,在聚合物的骨架上就留下一个与印迹分子形状、大小完全匹配,并含有与印迹分子特异性结合的功能基的三维孔穴(图 7.16)。因此,这个三维孔穴可以选择性地重新与印迹分子结合,即对印迹分子具有专一识别作用。这就使 MIP 具有天然生物分子识别系统最重要的特征:识别(recognize)和特异性结合(specially bind)。由于 MIP 是根据特定印迹分子“量身订做”的,所以建立在 MIP 基础上的仿生识别的特异性可以和单克隆抗体相媲美,故 Mosbach 教授将 MIP 诙谐地称为“塑料抗体”(plastic antibody)。由于用不同的印迹分子制备的分子印迹聚合物具有不同的结构和性质,所以一种印迹聚合物只能与一种分子结合,类似于“锁”和“钥匙”,对印迹分子有相当高的专一选择性。因此,分子印迹技术通常又被人们形象地描述为制造识别“分子钥匙”的人工“锁”技术。

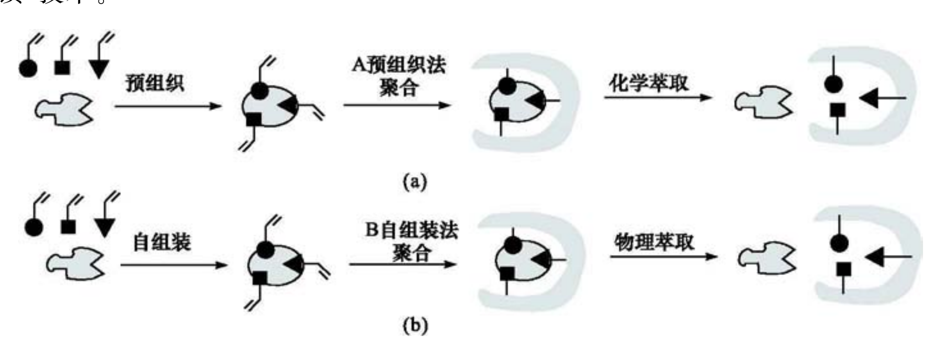


图 7.16　分子印迹基本原理

(a)预组织法聚合;(b)自组装法聚合

7.6.2　分子印迹技术的特点

Wulff[24]认为一种理想的分子印迹聚合物应具有以下的性质:①聚合物的结构应具有一定的刚性以保证印迹空穴的空间构型和互补官能团的定位;②聚合物

空间结构应具有一定的柔韧性以确保动力学平衡尽快达到;③具有亲和位点的可接近性,以提高分子识别过程的效率;④具有机械稳定性,以使分子印迹聚合物可以在高压下应用;⑤具有热稳定性,以便在高温环境下使用。

分子印迹技术之所以发展如此迅速,主要是因为它有三大特点[25]:①构效预定性(predetermination)。即模板分子和功能单体形成的这种自组装结构是在聚合之前预定形成的,所以人们可以按照自己的目的制备不同的 MIP,以满足各种不同的需要。②特异识别性(specific recognition)。即 MIP 是按照印迹分子定做的,它具有能识别该印迹分子的特定的识别空腔和识别位点,可专一地识别印迹分子。③广泛实用性(practicability)。即它可以与天然的生物分子识别系统如酶与底物、抗原与抗体、受体与激素相比拟,但由于它是由化学合成的方法制备的,因此又有天然分子识别系统所不具备的抗恶劣环境的能力,从而表现出高度的稳定性和长的使用寿命。已有研究表明,分子印迹聚合物反复使用 100 次之后印迹能力仍未发生明显下降,而保存 8 个月之后其性能也基本不发生改变。MIP 制备成本低是分子印迹技术的另一优点。与蛋白质识别系统和合成手性识别系统相比,制备 MIP 的成本是相当低的,而且印迹分子可以回收、重复使用。在开发具有催化活力聚合物方面,分子印迹技术可以创造自然界中不存在的具有全新催化活力的催化剂。所有这些优点表明,分子印迹技术具有非常诱人的发展前景。

7.6.3 分子印迹技术的分类

根据模板分子与分子印迹聚合物在聚合过程中相互作用的机制不同,分子印迹技术包括以下几种类型(图 7.17)。

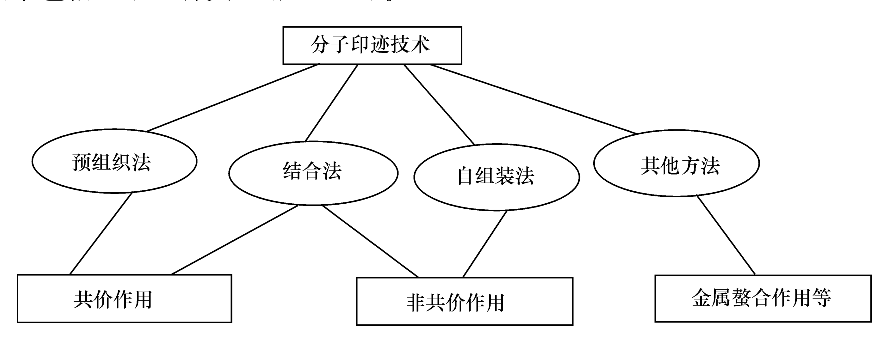


图 7.17 分子印迹技术的分类

1. 预组织法——共价结合作用

预组织法(pre-organized approach)又称共价(co-valent)法,是由德国 Heinrich Heine 大学的 Wulff 教授及其同事创立[22],Wulff 教授是分子印迹聚合物研究的先驱者之一。如图 7.16(a)所示,在预组织法的制备中,印迹分子与聚合物单

体在交联聚合前先以可逆共价键结合形成单体-模板分子复合物，然后交联聚合，最后再通过化学反应（如水解反应）将此共价键打开，释放出模板分子，得到分子印迹聚合物。这类聚合物的识别点的形状功能基的精确排列与被印迹分子是互补的，这是其高亲和性和高选择性的基础。

Katz 等[26]将 3 个三羟乙基硅烷通过酰胺键与一个芳香环相连，以此为印迹分子与无定型硅胶反应。印迹分子中的 3 个三羟乙基硅烷在反应中结合至硅胶的骨架上，反应完成后用碘代三甲基硅烷处理。除去芳香核，得到的材料可作为形状选择性催化剂。此合成方法适用于不同印迹分子。他们首次用物理吸附法检测到 MIP 具有对印迹分子吸附的微孔。

采用预组织法制备 MIP，其中关键的一个步骤就是在聚合反应前对印迹分子进行衍生化，即与功能单体发生反应生成共价化合物，但因印迹分子难以脱除，使这种方法的发展受到限制。但是它也有自身的优点，如在聚合物中能获得在空间精确固定排列的结合基团，结合力强，专一性高。若印迹分子能以高百分比脱除，则是一类很好的功能材料。

目前，已使用共价结合作用制备了对糖类及其衍生物、芳香化合物、腺嘌呤等具有分离作用的 MIP。所使用的共价结合基团主要包括硼酸、希夫碱、缩醛和缩酮类等，而其中最具代表性的是硼酸酯。硼酸基非常适合于共价结合。糖可以与硼酸根形成硼酸酯，利用这个作用可以先对糖进行衍生化，然后制备印迹糖的分子印迹聚合物。如以苯基-α-D-甘露吡喃糖苷为模板分子，4-乙烯基苯硼酸酯为功能单体，利用糖的羟基基团与硼酸根通过成酯形成模板分子与功能单体的复合物，交联聚合后，再在碱性条件下水解除掉糖分子，制得的分子印迹聚合物留有与印迹分子形状一样的孔穴，孔穴内还带有硼酸基团。由于该聚合物可以可逆选择性地结合印迹分子，所以可以拆分该糖的外消旋混合物（如图 7.18），而且选择性很高[27]。另外，以苯乙烯硼酸为功能单体的分子印迹聚合物已成功用于在碱性水溶液中分

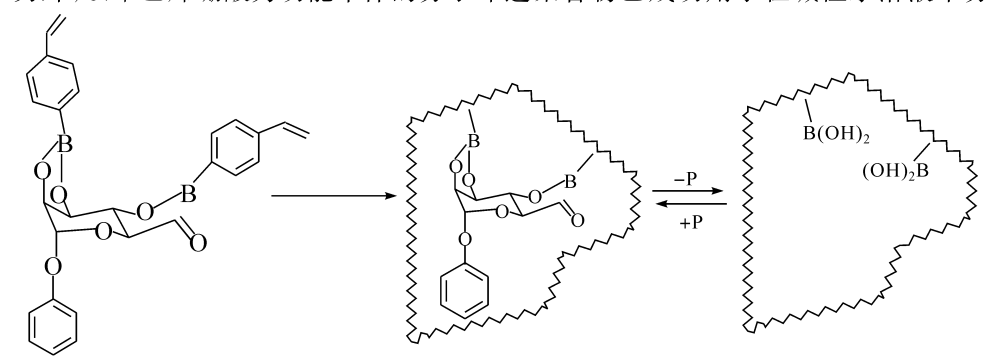


图 7.18　利用可逆共价结合进行的分子印迹

（苯基-α-D-甘露吡喃糖苷作模板分子）

离含二醇的化合物[28]。硼酸基与二醇能形成相当稳定的三角形的硼酸酯，在碱性水溶液中或在含氮的碱溶液中则可生成四角形的硼酸酯。这种四角形的硼酸与二醇能极快地达到平衡，平衡速度与非共价键作用相当。如果在聚合物中引入多个硼酸基团，则在拆分外消旋体中会呈现出很高的选择性[29]。

从理论上说，聚合物与印迹分子之间结合位点越多，其内部结合基团的方向和空穴结构定位越精确，聚合物呈现的选择性越高，但由于共价作用一般较强，在印迹分子预组装或识别过程中结合和解离速度较慢，不适合于快速识别，且其识别机制与生物识别相差甚远，故这种方法有待进一步改进。

2. 自组装法——非共价结合作用

自组装法(self-assembly approach)又称非共价(non-covalent)法，是由瑞典Lund大学Mosbach等在20世纪80年代首先开发的。非共价键型分子印迹聚合物的出现大大扩展了分子印迹材料的应用领域。利用非共价键的结合作用是使用分子印迹技术制备具有选择性的印迹聚合物的最简单的方法。如图7.16(b)所示，在自组装法中，印迹分子可通过非共价作用(如氢键、静电引力、金属螯合、疏水作用、范德华力)与功能单体之间预先自组织排列并形成多重作用位点，交联聚合后这种作用保存下来，然后通过淋洗的方法除去印迹分子，得到分子印迹聚合物。它是以超分子作用制备的仿生模型，其分子识别特性主要决定于印迹分子与印迹聚合物内功能基之间的相互作用，结合机制类似于天然生物分子，是分子印迹技术研究的热点，对此方面的研究近年发展很快。

氢键作用在许多有机化合物间很容易形成，因此是最方便也是应用最多的结合方式。目前，氢键作用已被广泛用于维生素、二胺、氨基酸及其衍生物、核苷等的印迹过程中。同静电作用相比，氢键作用力较强，选择性较好。同共价键相比，其作用力较弱，模板分子容易洗脱，且通过选择多个相互作用点也可大大提高模板分子与分子印迹聚合物的相互作用力，从而使分子印迹聚合物具有较高的选择性。

1993年Mosbach在“*Nature*”上发表了以茶碱(theophylline)为模板用自组装方法合成茶碱分子印迹聚合物的报道[23]，首次将自组装法应用到MIP的制备。他以茶碱为模板分子，甲基丙烯酸(MAA)为功能单体，利用两者间的氢键作用在惰性溶剂中形成主客体配合物，在偶氮二异丁氰(AIBN)的引发下，以乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂进行自由基共聚合，形成刚性聚合物，反复洗去模板分子后，即在聚合物中形成对茶碱有特异识别性的结合位点(图7.19)。这些结合位点可以通过氢键作用优先结合模板分子，可用此法识别及分离与茶碱结构类似的药物。

氢键在分子自组装方法中发挥着重要的作用，但是，如果在制备分子印迹聚合物及其后续过程中，只使用一种作用(如氢键)所制得的印迹聚合物的特异识别性

图7.19　利用可逆共价结合进行的分子印迹(茶碱作模板分子)

较差,而使用多种作用相互结合制得的印迹聚合物则有较高选择性和分离能力。Piletsky等[30]利用能产生氢键和静电作用的D(L)-苯丙氨酸[D(L)-phenylalanine]为模板制得了分子印迹聚合物。将该聚合物用于色谱大大改善了苯丙氨酸手性异构体的分离效果。另外,非共价键也可以和共价键结合起来使用,例如静电作用、电荷转移作用、氢键作用都能和共价键结合使用,所制得的聚合物的选择性有时比用单个共价键作用的MIP还要高。

常用的非共价作用的物质主要包括丙烯酸、甲基丙烯酸、三氟甲基丙烯酸等。与共价结合作用法相比,基于非共价相互作用的自组装分子印迹法则优越得多,具有简单易行,模板分子易于除去,且其分子识别过程更接近于那些天然的分子识别系统的优点,如“抗体-抗原”和“酶-底物”等。同时,在印迹过程中还可以同时采用多种功能单体,以提供给模板分子更多的相互作用,从而使此聚合物对印迹分子具有相当高的选择性。

3. 结合法

所谓结合法就是自组装法和预组织法的相互结合,即聚合时功能单体与印迹分子间作用力是共价键,而在对印迹分子的识别过程中,二者的作用是非共价作用。Whitecombe等[31]首次将两种方法结合起来创建了一种新的分子印迹技术。他们以胆固醇(cholesterol)为印迹分子,聚合时同功能单体以共价键结合,洗脱时发生水解反应,失去一个CO_2分子,则得到分子印迹聚合物。这种聚合物在后来的分离应用过程中则是以非共价作用的方式与印迹分子再结合。该法综合了共价和非共价分子印迹技术的优点,既具有共价分子印迹聚合物的高的亲和专一性,又具有非共价分子印迹聚合物的操作条件温和的特征。Vulfson等[32]在此基础上又

发展出了一种新的分子印迹技术——“牺牲空间法”(sacrificial space method)(图7.20)。该法的实质也是共价作用与非共价作用的综合。

聚合

脱去模板

结合模板

脱去模板

图 7.20　牺牲空间法示意图

具体就是,印迹分子与功能单体以共价键的方式形成复合物,实现分子预组织过程,交联聚合后,功能基团被固定在聚合物骨架中,去除印迹分子后,功能基留在空穴中。得到的分子印迹聚合物在识别过程中,印迹空穴中定位的功能基团与印迹分子之间发生非共键结合作用,实现分子自组装过程。研究发现,分子印迹聚合物对分子识别作用的本质是印迹聚合物与印迹分子之间在化学基团以及三维空间结构上的相互匹配性,也即分子印迹聚合物的选择性与印迹分子和功能单体之间相互作用的数量、强度及印迹分子的形态和刚性有关。

4. 其他方法

近年来,用功能单体和金属离子配位制备分子印迹聚合物也得到了发展。由于金属离子配位作用较强,使用金属离子配位功能单体可以避免强极性有机溶剂或水溶液对分子印迹聚合物的分子识别过程产生干扰。Toshifumi[33]在研究金鸡纳啶的分子印迹聚合物时采用 Zn^{2+}-卟啉(15)金属配位化合物作为功能单体与金鸡纳啶进行印迹,同时还可以作为荧光元件,获得了较高的选择性。对生物识别过程相互作用的研究表明,生物或药物分子和金属离子的结合具有高度专一性及温和的结合和断裂条件。

2000 年,Mosbach 等[34]又发展了一种新的印迹技术——固定模板法,以茶碱作为模板分子,以三氟甲基丙烯酸为功能单体。首先,将模板分子固定到一固态硅胶基质上,功能单体在其周围自组装形成复合物之后,加入交联剂聚合,用氢氟酸除去固态基质后,就得到了所需的印迹聚合物。该方法最大的优点就是不仅可以控制键合空穴的定位,而且可以控制印迹聚合物的表面形状。所以,此方法很类似于免疫学中用半抗原-蛋白结合物产生抗体的方法。在此工作基础上,王小如等[35]报道了一种用固定模板法制备分子印迹聚合物纳米线的技术(图 7.21)。他们以硅烷化的氧化铝膜为模板,将模板分子 L-谷氨酸固定到硅纳米管内壁,在将功能单体吡咯和氧化剂加入到纳米管内后,进行过氧化聚合,用化学溶解方法除去氧化铝模板,便得到了表面具有与模板分子相匹配的结合位点的印迹聚合物纳米线,该纳米线对谷氨酸显示出了较好的吸附效果。他们认为利用此方法制备的分子印迹聚合物纳米线尤为适合大分子质量多肽和蛋白质分子的印迹和识别,并且可以大大改善分子印迹聚合物在免疫分析及相关领域的应用。目前,利用该方法已经实现了蛋白质分子的印迹和识别[36]。

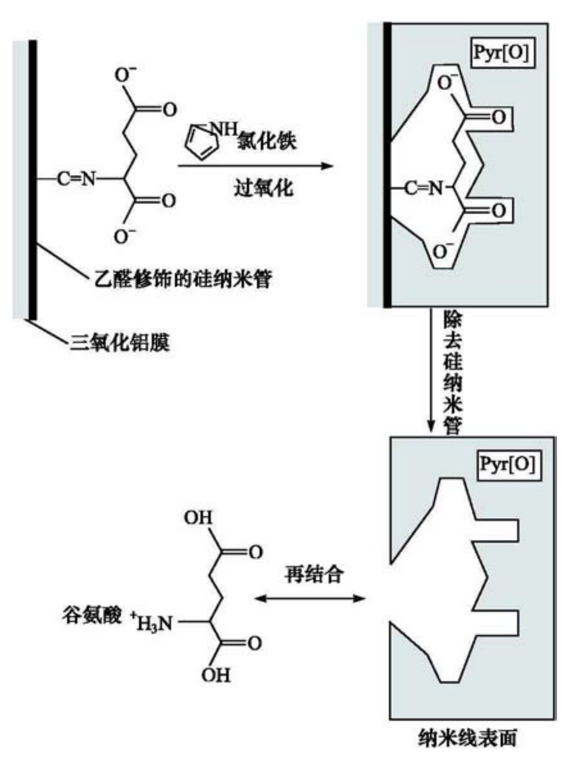


图 7.21　表面印迹纳米线的制备示意图

7.7 分子印迹聚合物的设计、制备与选择性

7.7.1 分子印迹聚合物的设计

在设计分子印迹聚合物时，选择合适的功能单体、交联剂、聚合和洗脱条件以及制备方法是获得分子识别性能的关键。分子印迹聚合物的设计通常包括以下步骤。

1. 印迹分子的设计和确定

印迹分子既能参加聚合反应，又易在聚合反应后去除。可用于分子印迹的分子很广泛，主要有糖类、氨基酸及其衍生物、核酸及其衍生物、生物碱、维生素、蛋白质、激素、辅酶、药物等，它们均已成功地用于分子印迹的制备中[37]。

2. 印迹分子与功能单体之间的相互作用

根据单体与印迹分子作用力的类型和大小预测，可以合理地设计、合成带有能与印迹分子发生作用的功能基的单体[38]。功能单体的选择主要由印迹分子决定，它必须带有能与印迹分子发生作用的功能基，如能与印迹分子成共价键的基团、产生氢键的基团或能与印迹分子发生离子交换作用的基团等，且在反应中当它与交联剂分子处于合适的位置时才能使印迹分子恰好镶嵌于其中。

常用的共价单体有：4-乙烯苯硼酸、4-乙烯苯甲醛、4-乙烯苯胺、4-乙烯苯酚等。常用非共价键单体有：丙烯酸及其衍生物、亚甲基丁二酸、4-乙烯基苯甲酸、2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸、N-丙烯酰基丙氨酸、4-乙烯基苯乙烯、丙烯酰胺、1-乙烯基咪唑、乙烯基吡啶、2,6-二丙烯酰胺吡啶、N-(4-乙烯苄基)亚氨二乙酸铜等。其中，最常用的体系为聚丙烯酸和聚丙烯酰胺体系，对某些金属螯合反应还常常用到亚氨基二乙酸衍生物。另外，天然聚合物如蛋白质也可以作为功能单体对其他分子进行印迹。

3. 聚合反应

聚合反应是在印迹分子和交联剂存在的条件下，对单体进行聚合。聚合方式有悬浮聚合、扩散聚合、表面印迹等。分子印迹过程主要通过自由基引发，其引发方式主要有高温热引发和低温光引发。具体的聚合条件选择则视具体情况而定。影响聚合反应的因素很多，如交联剂和溶剂的种类、单体浓度、聚合温度、光照等。常用的交联剂有：双甲基丙烯酸乙二醇酯、季戊四醇三丙烯酸酯、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯、*N*,*N*-亚甲基双丙烯酰胺、二乙烯基苯等。为保证特定空间构型的良好维持，通常需要控制较高的交联度（70%～90%），因此，交联剂的种类受到限

制。最初，人们用二乙烯基苯作为交联剂，但后来发现丙烯酸类交联剂能制备出更高的特异性聚合物。其中甲基丙烯酸乙二醇酯（EGDMA）较为常用，如三或四官能交联剂（如季戊四醇三丙烯酸酯或季戊四醇四丙烯酸酯）已经用于肽类分子印迹中。溶剂在分子印迹聚合物的制备（尤其是在非共价法的制备）中发挥着重要的作用，在聚合过程中，溶剂的某些性质控制着非共价键结合的强度，同时也影响聚合物的形态。通常情况下，溶剂的极性越大，产生的识别效果就越弱，这是因为溶液的极性决定着非共价作用的强弱。因此，非共价法多在氯仿、甲苯等低介电常数的有机溶剂中进行，而共价法则多在水、醇等介电常数较高的溶剂中进行。一般来说，低温下单体与印迹分子能形成更加有序、稳定的聚合物，选择性更好。

4. 印迹分子的去除

采用萃取、酸解等手段将占据在识别位点上的绝大部分印迹分子洗脱下来，通常采用一些高极性溶剂反复洗涤 MIP 以彻底除去印迹分子且洗涤过程非常缓慢，需要耗费大量的溶剂。所以，寻求一种快捷、彻底的洗涤方法对于简化 MIP 的制备过程非常重要。

5. 后处理

在适宜温度下要对印迹分子聚合物进行成型加工和真空干燥等后处理。所制备的 MIP 应具备良好的物理化学和生物稳定性、高吸附容量和使用寿命、特定的形状尺寸，以获得较高的应用效率。

7.7.2　分子印迹聚合物的设计与制备

分子印迹聚合物制备方法的研究主要围绕着两个问题展开，一是对材料的性能加以改善，以提高交换容量、材料的韧性等，使其适应于大规模生产和应用的需要；二是在水溶液体系中进行分子印迹，以解决水溶性分子，特别是生物大分子的印迹问题，扩大分子印迹技术的应用领域。

根据应用的目的不同对印迹聚合物材料的要求也不同。比如，对于作为色谱手性分离柱填料的 MIP 来说，要求有高的键合位点、快的结合动力学，由于对映体在柱中是靠多级键合-解离过程进行分离，因此，分析物的键合强度并不十分重要。但是，对于免疫分析，为了保证高选择性和高灵敏度，对分子印迹聚合物材料的亲和性要求比较高。因为在免疫分析中，被检测物质往往是极少量的，相比之下键合容量和键合动力学就显得不太重要了。所以，要选择最佳的合成方法，必须要综合分析研究的对象和应用的目的。迄今为止，分子印迹聚合物主要有以下几种制备方法：

1. 传统方法

将功能单体在溶液中排列在印迹分子周围，交联干燥之后将其研磨、破碎、筛分得到一定粒径的分子印迹介质，最后洗脱除去模板分子。此法的特点是简便、直接，但处理过程繁杂、模板分子难以脱除、吸附量低等缺点限制了该法的应用。

2. 悬浮聚合

悬浮聚合法是制备聚合物微球最简便、最常用的方法之一。该法采用全氟化碳液体作为悬浮介质代替传统的有机溶剂-水悬浮介质，从而消除了非共价印迹中存在的不稳定的预组织体，解决了聚合物需要研磨的问题，提高了原料的利用率。在色谱技术中，其固定相多数是用悬浮聚合法制备的。悬浮聚合可以有多步溶胀悬浮聚合和种子溶胀悬浮聚合，可以应用在水性环境中。Hosoya 等[39]用多步溶胀悬浮聚合制得粒径为 0.08nm、能印迹萘普生（*S*-Naproxen）的 MIP。该法虽有较好的单分散性和识别能力，但制备工艺烦琐、周期太长，因此，后来出现了种子溶胀悬浮聚合法。张立永等[40]制备了粒径更为均一的 MIP，并显示了较为优异的选择吸附性能。这种方法的特点是：聚合反应在水溶液中进行，所得的印迹聚合物可以用于极性环境中，同时产物有较好的规整性和单分散性。

3. 乳液聚合

将模板分子、功能单体、交联剂溶于有机溶剂中，然后将溶液移入水中，搅拌、乳化，最后加入引发剂交联、聚合，可直接制备粒径较均一的球形分子印迹介质。该法制备的聚合物是一类新的、有用的载体，粒子为纳米级（50～500nm），这类材料的显著特点是表面积大，可印迹水溶性分子。但是，纳米材料对色谱来说是不适用的，因此，既有大的表面积，又适合色谱应用的材料非常引人注目。用这种方法也可以制备 MIP 分离介质[41]。日本学者[42]报道了一种金属离子印迹的聚合物凝胶。这种方法需要使用一种既带有可与客体形成配合物的端基，又可聚合的表面活性剂单体。开始使用的是油酸，它含有烯基，可与二乙烯苯进行自由基乳液聚合，在铜离子存在下进行乳液聚合得到的粒子对铜离子的选择性高于钙离子，与非印迹聚合物相比，选择性提高了 1000 倍。磷酸盐表面活性剂也可作为主体表面活性剂使用，选择键合铜离子或锌离子。

若以油苯基氢磷酸盐为主体表面活性剂与 SDS 结合使用，SDS 与金属离子几乎没有配位能力，并且不干扰印迹过程[43]。以铜、铬、锌为印迹分子时对它们分别有选择性吸附。也可使用反应性主体表面活性剂 10-(*p*-苯乙烯)癸酸[44]。比较悬浮聚合法得到的大粒径粒子（0.08nm）的印迹效果后发现，该聚合得到的粒子吸附量是悬浮聚合粒子的 50～100 倍。

4. 表面印迹技术

通常采用的表面印迹法是在微球载体表面进行修饰制备分子印迹聚合物材料的一种方法,其优点是利用载体的物化稳定性,通过对载体本身性能调节来适应应用的需要。这样获得的分子印迹聚合物使识别位点处在颗粒的表面,解决了传统方法中对模板分子包埋过深或过紧而无法洗脱下来的问题,且得到的较均匀的球形颗粒可适用于各种操作,尤其是色谱操作。

最初,Sellergren[45]将糖蛋白转铁蛋白在溶液中与硼酸酯硅烷(boronatesilane)发生作用,然后在多孔硅胶颗粒上进行聚合。由于硼酸酯基团能与转铁蛋白上的硅铝酸发生可逆反应,硼酸酯硅烷与转铁蛋白的预结合使得硼酸酯基团能正确排列,因此保证了印迹位点对转铁蛋白的特异性。通过高效液相色谱的检测,该聚合物对转铁蛋白显示了微弱的特异性。

Mosbach等[46]在金属离子(Cu^{2+})和核糖核酸酶A存在的情况下,利用金属螯合单体在活化的硅胶颗粒上进行聚合。由于核糖核酸酶A存在两个暴露在分子表面的组氨酸,可以与两个金属螯合分子进行螯合作用。在聚合过程中金属螯合分子被固定到硅胶表面并生成特异性结合部位。Senel等[47]将汽巴弄蓝染料(Cibacron Blue F3GA)固定在聚酰胺的中空纤维膜上,用金属离子如Zn^{2+}、Cu^{2+}、Ni^{2+}螯合以吸附溶菌酶。实验表明,金属螯合的中空纤维吸附能力有显著的提高,而且被吸附的溶菌酶97%以上可在1h内被110mol·L^{-1} NaSCN和25mmol·L^{-1} EDTA洗液洗脱。用此法印迹蛋白质,要求蛋白质表面必须有暴露的氨基酸残基,如组氨酸的咪唑基、半胱氨酸的巯基、色氨酸的吲哚基等,从而使该方法的广泛应用受到限制。

Burow等[48]以活化的硅球为基质,用硅胶表面的乙烯基与丙烯酸和丙烯酰胺共聚,得到的葡萄糖转化酶(GOD)印迹聚合物对GOD具有识别能力。后来有人用同样的方法对溶菌酶进行了印迹,得到的MIP对溶菌酶具有识别能力,且可多次重复使用而不破坏识别位点。后来,Shi等[49]又发展了一种新的表面印迹技术,他们将蛋白质首先吸附在云母上,然后用一薄层的二糖分子包在被吸附的蛋白质上,使糖层与蛋白质通过氢键结合,再在糖分子表面聚合上一层荧光聚合物薄层,最后除去云母,溶解掉蛋白质分子,就生成了具有蛋白质形状孔穴的聚二糖表面印迹聚合物。吸附试验显示在混合蛋白质溶液中,清蛋白、免疫球蛋白、核糖核酸酶A和溶菌酶的印迹聚合物都能更特异性地吸附相应的印迹蛋白质。

Guo等[50]以交联的壳聚糖微球为基质,以丙烯酰胺为功能单体制备了血色素(hemoglobin)的印迹聚合物材料。该表面印迹技术是在聚合之前,使丙烯酰胺单体和蛋白质分子首先扩散到交联壳聚糖微球的孔穴内,聚合后,选择性的聚丙烯酰胺软溶胶就被嵌入到孔穴内,从而得到对血色素具有识别能力的聚合物材料。用

稳态吸附法印迹聚合物进行初步表征,结果显示该聚合物对血色素具有很好的吸附性。但是,由于壳聚糖和聚丙烯酰胺之间不存在化学键作用,这使聚丙烯酰胺随着使用次数的增加而很容易从壳聚糖微球的孔穴中洗脱。所以,最近他们又对此法进行了改进,即对壳聚糖微球进行修饰(引入双键),再将聚丙烯酰胺溶胶嫁接到修饰后的壳聚糖微球上,这就使聚丙烯酰胺和壳聚糖基质之间的作用力通过化学键作用得到了增强。用色谱方法对此印迹聚合物材料的吸附和解吸过程进行动力学表征,结果显示该印迹聚合物材料在蛋白质的高选择性分离方面具有非常好的应用前景[51]。

最近,王小如等[36]以硅烷处理过的氧化铝膜为模板,并对硅纳米管的表面进行修饰(引入乙醛基),然后将模板分子(白蛋白、血色素、细胞色素 c)固定在硅纳米管内壁,之后浸入到功能单体丙烯酰胺和交联剂 *N*,*N*-亚甲基双丙烯酰胺的混合溶液中,在氧化剂过硫酸胺的存在下进行过氧化聚合,最后用化学溶解方法除去氧化铝模板,便得到了表面具有与模板分子相匹配的结合位点的印迹聚合物纳米线,该聚合物纳米线具有较高的表面积和较好的单分散性。实验结果显示,目标蛋白质分子很容易扩散到印迹纳米线表面的识别位点,而且高的印迹表面积使表面印迹纳米线对蛋白质分子具有较大的吸附容量。该表面印迹技术有望用于其他生物大分子(如 DNA、病毒等)的印迹。

5. 抗原决定簇印迹技术

近年来表面印迹技术得到了很大的发展。但遗憾的是,利用金属螯合作用的表面印迹技术只能应用于含有裸露组氨酸基的蛋白质,并且金属螯合作用的特异性识别作用不强。Rachkov[52]提出的抗原决定簇法是一种分子印迹的原理。抗原与抗体的专一性结合是生物体普遍存在的现象,抗原分子上能与抗体专一结合的特定部位,称为抗原决定簇(或称抗原表位)。其原理来源于自然界中的相似方法,即抗体在识别抗原时,抗体只与抗原的一小部分,即抗原决定簇相作用。其作用原理如图 7.22 所示。该法是基于将已知序列的生物大分子(包括蛋白质、病毒、细菌和细胞等)表面的一段多肽片段(即抗原决定簇)作为模板分子,加入功能单体,并和抗原决定簇进行分子自组装,通过聚合反应将自组装的功能型单体在空间上加以固定,再用化学或物理方法除去模板,得到表面带多肽识别位点的分子印迹聚合物。合成的 MIP 能有效识别整个多肽、蛋白质等生物大分子。抗原决定簇印迹技术的关键在于对蛋白质三级结构的掌握和特异短肽片段的选取。由于该法在空间因素和热力学因素两方面均满足了大分子印迹的要求,不但使蛋白质印迹变得简单,同时使病毒、细菌和细胞的分子印迹仿生识别成为可能。Rachkov[53]采用该法,以甲基丙烯酸(MAA)为单体,乙二醇二甲基丙烯酸(EGDMA)为交联剂,首先对 YPLG(Tyr-Pro-Leu-Gly-NH_2)四肽进行了印迹。HPLC 检测表明,以 YPLG

为印迹分子得到的聚合物不仅可识别 YPLG,也可识别以 PLG(Pro-Leu-Gly-NH_2)为决定簇的催产素分子。抗原决定簇印迹技术的成本低,因为小肽通常并不昂贵,而且比蛋白质易得。对于80%~90%的蛋白质而言,通常其C端的7~9个氨基酸就可以作为其特征结构的决定基。

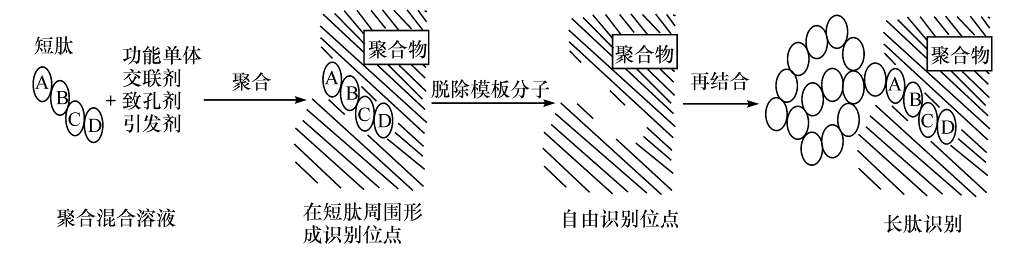


图7.22 抗原决定簇法示意图

Tai等[54]以丙烯酸和丙烯酰胺为功能单体,以登革热病毒蛋白质(dengue virus NS1 protein)的线性抗原决定簇十五肽(Thr-Glu-Leu-Arg-Tyr-Ser-Trp-Lys-Thr-Trp-Gly-Lys-Ala-Lys-Met)为模板分子,在质量变化传感器芯片表面形成了分子印迹聚合物膜,并与蛋白质基质印迹法进行了比较(图7.23)。研究发现,用该法制备出的印迹聚合物对蛋白质模板分子显示出了较高的特异性识别,并且能够直接用于血清中登革热病毒及其他过滤性毒菌蛋白质的直接检测以及抗体存在的检测。

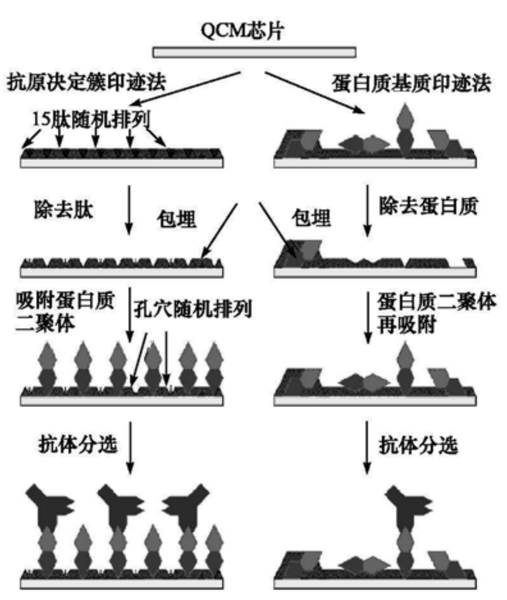


图7.23 抗原决定簇印迹法与蛋白质基质印迹法比较

与传统分子印迹聚合物制备方法相比，抗原决定簇印迹法具有以下优点：①避免了目标分子被嵌入和包埋在聚合物中；②减小了印迹聚合物与目标蛋白质分子之间的非特异性相互作用；③所有结合在印迹聚合物表面的目标蛋白质分子都呈有序排列；④目标分子可以快速有效地得到洗脱，从而增加了印迹聚合物的再度使用性。

7.7.3 分子印迹聚合物的选择性

前面讲到，理想的 MIP 应具有刚柔相间的分子结构、好的机械稳定性及热稳定性以及耐高温和高压等特性。这里的刚性就是指聚合物在脱去印迹分子后仍能保持孔穴原来的形状和大小，柔性则保证了底物与孔穴的结合动力学能尽快达到平衡。

从分子印迹机制分析影响分子印迹聚合物的选择性的因素，主要从以下几个方面考虑。

1. 功能单体

功能单体的性质直接影响聚合物功能基与印迹分子之间的相互作用。作用力越强，聚合物对印迹分子的识别与结合能力也就越强，选择性就越高。为了使印迹聚合物对印迹分子具有高的选择性，功能单体的选择主要由印迹分子的性质决定，因为印迹分子决定了功能单体上基团的定向。碱或酸性的模板分子分别采用酸或碱性的功能单体会使分子间产生比氢键作用更强的离子作用。如赖家平等[55]用酸性的 MAA 为功能单体，碱性的 4-氨基吡啶为模板分子制得的印迹聚合物对 4-氨基吡啶表现出较好的结合能力与高的选择性。这是因为 MAA 可与被印迹的分子形成较多的作用位点，可以通过氢键作用、离子作用与印迹分子形成非共价的主-客体配合物，因此由其制备的 MIP 具有较高的选择性和结合能力。对于酸性模板分子，通常采用碱性的丙烯酰胺、乙烯基吡啶作为功能单体来进行印迹。如 Haginaka 等[56]在研究从水相中的分离时发现，用 4-乙烯吡啶或 2-乙烯吡啶为功能单体制备的聚合物比用 1-乙烯吡咯烷酮为功能单体制备的聚合物萘普生具有更好的识别与结合能力。功能单体双键与功能基的相对位置也会影响到其与模板分子间作用力的强弱，如用 4-乙烯吡啶为功能单位制备的聚合物比用 2-乙烯吡啶为功能单体制备的聚合物具有更好的识别与结合能力。此外，功能单体的功能基数目及单体的用量均会影响孔穴中识别点的数量，从而影响聚合物对印迹分子间的识别与结合能力。

2. 交联剂

交联剂是制备 MIP 的一个重要因素，交联剂的类型及用量直接影响 MIP 对

印迹分子的选择性和结合容量。这是因为在MIP制备过程中,加入交联剂是为了固定功能单体与印迹分子形成主-客体配合物,以便形成刚性聚合物,交联剂的种类及用量会影响聚合物的刚性,从而影响聚合物孔穴形状及功能基团排列的稳定性。使用多官能团的交联剂能提高聚合物的交联度,增强聚合物的刚性,有利于保持识别点的整体性,使结合与识别能力较强[57]。如使用季戊四醇三丙烯酸酯(PETRA)为交联剂制备的印迹聚合物的识别与结合能力大于以新戊二醇二丙烯酸酯(NPGDA)为交联剂合成的聚合物[58]。用含有芳环的交联剂也可增强聚合物的交联度和刚性,如对苯二烯(DVB)为交联剂合成的聚合物比乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂合成的聚合物具有更好的识别能力[59]。用旋光性交联剂制备的印迹聚合物能造成与印迹分子有附加的手性相互作用,提高手性分辨率。此外,交联剂的用量也会影响聚合物的刚性。聚合物的交联度一般要求在80%以上,交联少会降低聚合物的刚性,难以保持结合位点的形状和其中功能基的取向,交联多会使聚合物刚性过强,这两种情况都会使其识别位点可接近性差、分辨率下降。因此,在选择交联剂时,既要使合成的聚合物具有一定的刚性以维持孔穴的形状,又要求它有一定的柔韧性,以使识别点具有较好的可接近性,从而提高其结合能力。

3. 溶剂

由于印迹聚合物对印迹分子的识别作用深受周围环境的影响,因此对相关环境因素的考察就显得十分重要。溶剂在MIP的制备中发挥着重要作用,对印迹分子与印迹聚合物之间的作用强度影响很大。在制备MIP时,要求所用溶剂都对印迹分子有较好的溶解性,而且能促进印迹分子与功能单体的相互作用。早期的研究工作主要集中在非水的有机环境中,因为非极性溶剂中,印迹分子主要靠超分子作用与功能单体结合,极性强的溶剂会降低印迹分子与功能单体的结合能力,干扰氢键形成,使生成的MIP识别能力较差。所以,常常选用各种非极性的烷烃以及一些极性有机化合物,如甲醇、乙腈、氯仿等[22,60,61]作为溶剂。大量的实验结果表明,通过改变作用环境的极性,调节溶剂的组成成分,可以对印迹聚合物的识别效果、亲和性和选择性产生有效的影响。体系的亲和能力和选择性遵循一定的作用规律,对其控制和掌握比较容易。如董襄朝等[62]以水杨酸为印迹分子,MMA为单体,TRIM为交联剂,分别用乙腈和氯仿为溶剂制备印迹聚合物,用于分离邻羟基苯甲酸异构体。结果发现,以乙腈为溶剂的聚合物比用氯仿为溶剂的聚合物对印迹分子具有更强的亲和力。Huang等[63]比较了不同混合溶剂环己醇/十二烷醇、甲苯/二甲亚砜、甲苯/十二烷醇、甲苯/异辛烷对聚合物识别性能的影响,结果发现,以高极性的环己醇/十二烷醇或甲苯/二甲亚砜为溶剂制得的聚合物对底物没有选择性能;甲苯/异辛烷虽极性较低,但其对印迹分子的溶解性能较差,显示较

差的识别性能;甲苯/十二烷醇为溶剂的聚合物拥有较好的选择性。甲苯与十二烷醇的比例增加,印迹聚合物的平均孔径下降,分离因子增大,当比例为 10%时,识别性能最好;继续增大比例,则孔径太小而使印迹分子无法通过,导致识别性能降低。此外,溶剂的用量对分子印迹聚合物对印迹分子的亲和性也会产生很大的影响。随着分子印迹聚合物的研究重点从油溶性的有机小分子转移到水溶性化合物,特别是生物大分子,水环境下(包括含水的有机环境下)的分子识别问题已日益引起人们的关注[64~66]。与有机介质不同的是,由于有水分子的参与,水环境下的分子识别问题要复杂得多,水溶液的组成、pH、溶液中盐的离子强度、极性有机溶剂的加入、比例和种类等,均会对印迹聚合物的选择性产生显著的影响。

4. 印迹聚合物与印迹分子间相互作用

对不同的印迹体系,印迹聚合物与印迹分子间相互作用的类型和强度也会不一样[67]。从作用性质上看,以非共价方式结合的分子印迹聚合物材料在对印迹分子的识别过程中主要涉及一些弱相互作用。按照作用能量的大小排列,对识别作用影响最大的首先要算是静电相互作用,即常说的离子键。与其余几种相比,静电相互作用的键能是最大的,数量级与共价作用相似。氢键对识别作用的影响次之,其键能比普通的化学键要弱,一般仅有 12～34kJ · mol^{-1}。需要指出的是,当形成氢键的 N、O、C、H 等原子排在一线时,其键能可以达到最大,约为 33kJ,这就是常说的氢键的方向性。最后一种是普遍存在于分子间的弱相互作用——范德华力,它分为偶极-偶极相互作用、偶极-诱导偶极相互作用、瞬时偶极间的相互作用三种。疏水相互作用的产生是因为一些疏水基团或是疏水区域间的彼此挨靠,是它们为了避开水介质这个大环境而被迫聚集在一起的一个自然趋势,所以不应该被算作是一种力。

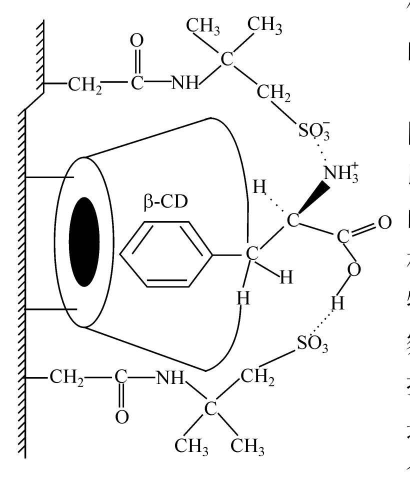


图 7.24 分子识别中的静电和疏水作用

就具体的印迹体系而言,影响选择性的一些因素往往同时存在。除了印迹分子和聚合物本身以外,分子识别作用的发生环境对整个印迹体系的最终表现始终有至关重要的影响,而若干种弱相互作用也往往会结合在一起共同达成印迹聚合物对印迹分子的综合识别效果。Piletsky 等[30]考察了以苯丙氨酸为印迹分子构成的印迹体系中选择性的影响因素。由图 7.24 可见,该体系可以通过 β-环糊精的疏水空腔和邻近的磺酸基团协调配合,以静电和疏水两种弱相互作用结合的方式对印迹分子产生良好的识别效果。

Nicholls 等[68]选择甲基丙烯酸和二甲基丙烯

酸乙二醇酯组成聚合体系，通过色谱方法研究了其对二肽印迹分子的识别行为，发现氢键和疏水作用在该识别体系中扮演了重要的角色，流动相中水含量的多少对识别效果有着明显的影响。采用与 Nicholls 相同的聚合物体系及研究手段，Rachkov[53] 仔细考察了水环境下印迹聚合物对结构相似的催产素(oxytocin)系列多肽的识别问题。结果显示，流动相的 pH、离子强度以及有机溶剂的添加比例都与识别结果相关，其中所涉及的相互作用包括静电、氢键和疏水三种。

另外，从印迹聚合物孔穴的空间结构看，印迹聚合物孔穴的空间结构与模板分子的构型、构象的完美匹配有利于印迹聚合物功能及模板分子功能基的充分靠近并进行专一性结合，从而提高了印迹聚合物对模板分子的选择性。但聚合物孔穴的结构和形状并不是完全刚性和一成不变的。脱去模板分子的聚合物在溶剂中往往会发生溶胀现象，使其孔穴的大小和形状都发生改变，从而使选择性和亲和力发生不同程度的改变。实验证明，聚合物构象的改变是通过溶剂与聚合物链间的相互作用引起的，所以，一般要求聚合物制备时使用的溶剂应尽量与识别过程中所用的溶剂一致，以减少溶胀现象对聚合物选择性带来的影响。

5. 印迹聚合物的结合位点

非分子印迹聚合物(即未用印迹分子制备的聚合物)常常也具有一定的与印迹分子结合的能力，称为非特异性结合。为了清楚地说明亲和性，我们假设：与非分子印迹聚合物相比，分子印迹聚合物具有更多的与印迹分子相互作用的位点。在印迹分子和聚合物之间发生的单一的或双重的相互作用的一部分将影响选择性。也就是说，即使是分子印迹聚合物也存在着大量非印迹区域。这些区域也可能与印迹分子或非印迹分子结合，这种结合减弱了印迹分子与真正印迹部位的相互作用，从而使所获得的选择性不如预期效果。因此，聚合物中的结合位点数量对选择性相互作用有重要作用，通常小于 1%，但可以达到理论最大结合位点的 35%[69]。这就要求我们要讨论在不同的条件下，选择性(聚合物的印迹区域)和非选择性(聚合物的非印迹区域)相互作用对印迹聚合物可应用性的影响。图 7.25 示意了选择性和非选择性的相互作用。该聚合物含有几种结合位点。通

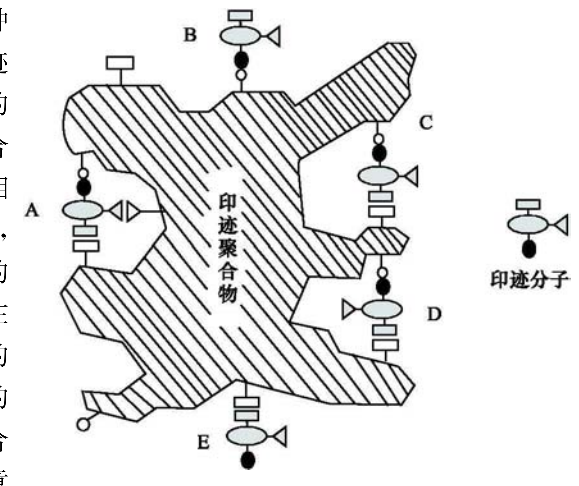


图 7.25　分析物与合成聚合物之间相互作用示意图[70]

常,作用位点越多,结合常数越大,聚合物对印迹分子的选择性和亲和性也越高。A 部位具有 3 个结合位点,是最合适的结合部位,表现为对印迹分子的选择性。C 部位和 D 部位分别为双结合位点,印迹分子可以以不同的方式靠近结合部位,与聚合物相互作用的选择性较低。而 B 部位和 E 部位分别只有一个结合位点,结合常数最小,选择性最差。

6. 聚合温度

温度在一定程度上也影响印迹聚合物的选择性。一般情况下,低温聚合可以稳定印迹分子与单体间的复合物,以形成更加有序的识别位点,同时还能改变聚合物的物理性质,具有制备较高选择性聚合物的可能。如 Chen 等[71]详细研究了分离环境温度对以苯丙胺酰苯胺(L2PA)为模板的印迹聚合物的影响,将聚合物分别在不同的温度(50℃、120℃、140℃和 160℃)下进行热处理 24h 后发现,低温下制备的聚合物对 L2PA 具有较高的结合力,而经 120℃和 140℃处理的聚合物对 L2PA 的结合能力有较大的下降,下降幅度要大于对 D2PA 的结合能力下降的幅度,160℃下放置的聚合物基本上无法分离对映异构体。

7.8 分子印迹技术的应用

MIP 具有制作简单、成本低廉、功能可设计、坚固耐用且适用范围广等优点,因而被誉为“万能的分子识别材料”。近年来,MIP 在分离领域、模拟抗体和受体、酶模拟以及仿生传感器等许多方面显示出了广泛的应用前景。

7.8.1 分离领域

分子印迹技术提供了一种简单、可直接制备具有分子识别能力分离材料的方法,在以固相萃取、色谱和电泳为手段的分离中都有应用,其适用的印迹分子范围宽广,涉及氨基酸及其衍生物、核苷酸、多肽、单糖、某些重要的化学分子等。

Sellergren[72]首次报道将分子印记聚合物应用于固相萃取(solid phase extraction,SPE),近年来有关该方面的报道逐渐多了起来,特别适用于药物或内源性分子(如组织激素等)以及医药、食品和环境分析样品的制备。到目前为止,MIP-SPE 主要还是用于小分子的分离分析,对于这些化合物,与采用抗体为基础的亲和色谱分离相比效果相似。作为固相萃取固定相的 MIP,除了具有高度的选择性和制备简单的优点外,在有机溶剂中良好的相容性使得 MIP-SPE 在对疏水性物质的分离中具有独特的优点。

由于 MIP 有高度空间选择性,可以作为色谱固定相,广泛应用于拆分外消旋体。一般的过程是 MIP 制备后,经处理粉碎成一定大小的适合的粒度装柱,然后

进行分离,也有在柱中直接制备 MIP 的报道。Wulff[27] 首先把分子印迹聚合物作为高效液相色谱固定相,拆分模板 α-D-甘露吡喃糖苯苷的外消旋体,此外,在非手性分子的识别分离方面也有了新的进展。Shea 等[73] 使用 9-乙基腺嘌呤(9-ethyladenine,9-EA)为模板,制得的印迹聚合物用于高效液相色谱固定相,对模板分子选择性极高,类似于经过多步制得的低分子质量受体的选择性。Kempe[74] 报道了利用以 MIP 作为固定相,对氨基酸的同系物进行了液相色谱分离,不同的氨基酸有一个洗脱顺序,得到了较好的分离效果,值得一提的是低溶性的、无活性的异构体往往先被洗脱掉。Zucconi 等[75] 将人脑 cDNA 片段插入噬菌体 T7 编码衣壳蛋白的基因上,筛选到了与 synaptojanin 富含脯氨酸的羧基端结合的蛋白质,分析了 50 个克隆,得到 7 个作用蛋白。Peter 等[76] 将针对 11-α-羟基孕酮或皮质酮的 MIP 应用于高效液相色谱,筛分了包含有这两个物质的 12 个结构类似的固醇,取得了很好的分离效果。

随着药物研究的不断深入,人们逐渐认识到药物的有效成分往往具有不同的手性性质,尽管分子式相同,但其药效不同,甚至相反。因此,有必要采取适当方法对其对映体或异构体进行拆分。分子印迹技术已经广泛的用于药品的手性拆分中,这是相当重要的一面。目前约有 500 多种旋光性药物出现在市场上,而 90%作为外消旋混合物管理,而手性混合物中,其中一种旋光性药物,往往具有毒副作用。基于这一事实,一些国家对新的手性药物提出了要求,要求必须进行分离和分别管理,进行各自的毒理和药理试验。大量研究表明,分子印迹能够满足这一技术要求,将手性混合物拆分,并易于实现商业化、规模化。图 7.26 是苯丙氨酸(phenylalanine)的手性拆分谱图,图中显示,L 和 D 型苯丙氨酸在分子印迹聚合物柱上得到了很好的分离,分离度高达 17.8。

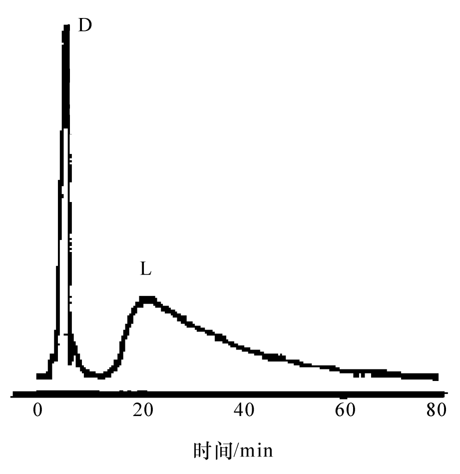


图 7.26 苯丙氨酸的手性拆分谱图[30]

7.8.2 模拟抗体和受体

基于抗体-抗原反应的免疫分析以其高特异性和高灵敏度等特点,已得到了广泛应用。但是天然生物抗体由于缺乏保存和操作的稳定性,在某些领域限制了它们的进一步应用。用分子印迹技术制备的人工抗体和受体,由于具有类似生物抗体的高亲和性和高专一性,不需实验动物和免疫技术。从理论上来说 MIP 是对生

物抗体的一种有益补充，且 MIP 模拟天然受体可识别生物碱、药物、氨基酸、多肽、糖甚至蛋白质，可用于纯化、手性分离等，前景非常诱人[77,78]。因此，MIP 模拟天然抗体和受体已引起了人们极大的兴趣。

许多研究证明，分子印迹聚合物可以用作制备人工抗体，作为免疫实验的识别物质。1993 年，Vlatakis 等[23]首次在这一领域做了报道，他们用支气管扩张药品茶碱和安神药安定制得的印迹聚合物显示出了惊人的专一识别性。通过竞争性放射免疫测定发现，MIP 的相关识别结构不存在或远低于印迹分子，但它们的交叉反应同单克隆抗体一致。Mosbach 等[23]用分子印迹聚合物代替抗体在放射免疫检测中检测茶碱、吗啡和一些内源性药物等也取得了与单抗相似的交叉反应(cross-reactiviry)。这一方法经进一步优化有望取代从动物身上分离抗体和用细菌生长抗体的非常繁杂的工作。值得注意的是，某些天然抗体的印迹聚合物是难以获得的，如免疫抑制性药品和小分子非免疫性物质。对于小分子化合物，通常需连接一个载体分子，但这样可能会导致抗原性物质发生相当大的变化。1998 年，Haupt 等[65]曾在 2,4-二氯乙酸印迹聚合物的测定中提及这一问题。

基于分子印迹的检验方法具有极高的灵敏度，能识别化合物的细微差别。如咖啡碱仅比茶碱(1,2-二甲基黄嘌呤)多一个甲基，就不能进入茶碱印迹聚合物而被识别，显示出了惊人的专一性识别能力。当这些印迹聚合物被用于竞争性实验时，对结构相近的物质的结合能力或者完全没有，或者远低于模板分子的结合能力。Mosbach 等[23]通过实验证明抗茶碱(antitheophylline)印迹聚合物完全能够区分印迹分子和结构上非常相似的咖啡因(caffeine)，而茶碱和咖啡因在化学结构上只有一个甲基的差别，用一般的方法是很难把两者区分开来的。更惊人的是这些分子印迹聚合物的交叉反应与这些药物的单克隆抗体的交叉反映几乎是相同的。抗茶碱分子印迹聚合物用于检测患者血浆样品中茶碱的含量完全符合医学检验要求。这也证明印迹聚合物抗体和受体完全可以作为生物抗体的理想替代品和有益的补充。Andetsson 等[79]成功的制备了吗啡(morphine)和亮脑啡肽(leucine enkephalin，YGGPL)印迹聚合物，该聚合物可以用作人工镇静剂抗体，分析血液中药物的浓度，所得结果与用免疫分析得到的结果相比较，表明 MIP 具有同抗体相似的选择性结合能力和交叉反应分布，性能稳定、易制备。whitecombe[31]和 Piletsky 等[80]分别成功地合成了聚合物的胆固醇和阿特拉津(Atrazine，一种杀虫剂)的受体，这些研究进展有望在医疗检测中获得应用。Ramström 等[81]报道了用皮质醇(hydrocortisone)为印迹分子，利用非共价方法制备了甾类分子印迹的体系，并通过放射性免疫法测定了聚合物对皮质醇的结合特征。研究表明，在印迹聚合物中产生了分散的结合位点，其中小部分是高吸附位点，而大部分是低吸附位点，聚合物对皮质醇的选择性较低。在此工作基础上，Baggiani[82]以该聚合物为 HPLC 固定相对皮质醇的吸附和选择性能进行了研究，发现以皮质醇为印迹分子

的 MIP 对目标分子显示了良好的选择性,可以明显的将其和其他结构类似的化合物区分开来。

近年来,免疫性能测定的研究工作主要集中在寻找一种新的不依赖于无线电波的检测手段,如荧光标记测定、酶联免疫测定和电化学测定等。朱庆枝[83]利用分子印迹技术,制备了卵清白蛋白(egg albumin,EA)的人工抗体,研究了其对抗原的特异性吸附能力,在此基础上,模拟竞争型免疫反应,并建立了卵清白蛋白的仿生荧光免疫分析方法。Haupt 等[84]创建了一种基于分子印迹聚合物代替天然抗体的类似于竞争酶免疫分析法的分子印迹成像酶联免疫分析。他们用过氧化烟草酶标记抗原——2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),并在发光氨酸的存在下,采用竞争模式对目标分子进行化学发光定量检测。定量分析发现 2,4-D 在 0.01～100μg·ml^{-1} 浓度范围内表现出了较好的线性响应。该方法可以实现多种样品的同时测量。后来他们又对其检测方法进行了改进,设计了一种流动注射-ELISA 型 MIP 分析法,实现了在线检测[85]。

MIP 识别多肽的能力受下列因素的影响:多肽靶分子和印迹分子之间结构的差异;多肽本身的光学结构;多肽的序列;构成多肽的氨基酸残基的种类和数目;位于识别位点周围环境的极性等。研究者构建了一系列具有不同数目的氨基酸残基的多肽物,从单体到八聚体分别作为印迹分子来构建聚合物中手性分子识别位点,结果表明由四肽衍生物获得的 MIP 可以获得最佳手性识别能力。如 Rachkov[53]利用抗原决定簇印迹法分别使用四肽 Tyr-Pro-Leu-Gly、乙酰-L-酪氨酸乙酯(acetyl-L-tyrosine ethyl ester)、亮氨酸-脑啡肽(YGGPL)、Pro-Leu-Gly amide(PLG)为模板分子制备了对脑下垂体叶下荷尔蒙有印迹效果的聚合物。实验证明,以四肽 Tyr-Pro-Leu-Gly 为模板分子制备的 MIP 对所属蛋白质具有较好的印迹效果。

以蛋白质为印迹分子进行印迹得到的 MIP 可以作为抗体、酶或其他天然生物结构的替代物。但是,蛋白质属于生物大分子,它本身的一些性质(如非刚性、复杂空间结构以及具有生物活性等)使其印迹难度远远高于对小分子的印迹。目前,有关蛋白质的印迹已有一些报道,如 RachRov 等[52]采用本体聚合法,以丙烯酰胺为单体合成了低交联度的凝胶,对血红蛋白、生长激素、红细胞色素、肌红蛋白和核糖核酸酶等进行了印迹。经过含 10%SDS 的乙酸(10%)溶液洗脱印迹分子,可得到具有良好选择性的 MIP,不同的印迹分子能被相应的凝胶所吸附,而非印迹蛋白质则不能被吸附。Venton 等[86]合成了印迹分子分别为脲酶和牛血清蛋白的聚硅氧烷聚合物,印迹分子用链霉蛋白酶降解,每种 MIP 都对其印迹分子显示出了较弱的特异性吸附。尽管本体聚合印迹技术比较简单,但存在印迹位点分布在整个介质、聚合物形态不规则、印迹分子不易洗脱、颗粒内部扩散阻力大等弊端。后来发展的表面印迹以及抗原决定簇印迹法使蛋白质的印迹得到了极大改善。利用蛋白质分子印迹聚合物制备的模拟抗体可代替天然抗体用于免疫分析中,经过分子

印迹的球形聚丙烯酰胺凝胶颗粒可能在放射免疫分析和酶联免疫分析中有所应用，这样可不需要用于制备抗体的实验动物及相应的免疫技术。另外，天然抗体难于回收再利用，而模拟抗体可重复利用。

目前，一些科学家正在尝试将分子印迹技术应用在人工生物膜的合成方面。他们设计印迹膜等作为选择性转运目标药物、蛋白质、其他重要分子的人工细胞膜，并取得突破性进展，从而扩展了分子印迹技术的应用领域。Shea[73]报道了以9-乙基腺嘌呤为印迹分子，将N，N-二甲基甲酰胺溶液涂在硅烷化的玻璃薄片上，在氮气保护下进行聚合反应，并用制备出的印迹聚合物膜进行膜运输实验。实验表明，腺嘌呤的流通量明显高于胞嘧啶和胸腺嘧啶，腺苷的流通量大于鸟苷，说明这种运输是印迹聚合物膜对腺嘌呤选择性运输的。另有文献报道，人们已开始利用人工多肽受体识别特异的多肽序列，N端组氨酸能与聚合的Ni(Ⅱ)-NTA复合物发生协同作用[87]。即将各个单体分子经聚合反应连接并除去连接的目标多肽，这样得到的印迹聚合物可以选择性地结合目标多肽(His-Ala)。如图7.27所示，人工膜和Ni(Ⅱ)次氮基三乙酸复合物协调作用能够大大促进含组氨酸的转运。另外，它们在作为受体筛选多肽及其模拟物方面也很具发展潜力。

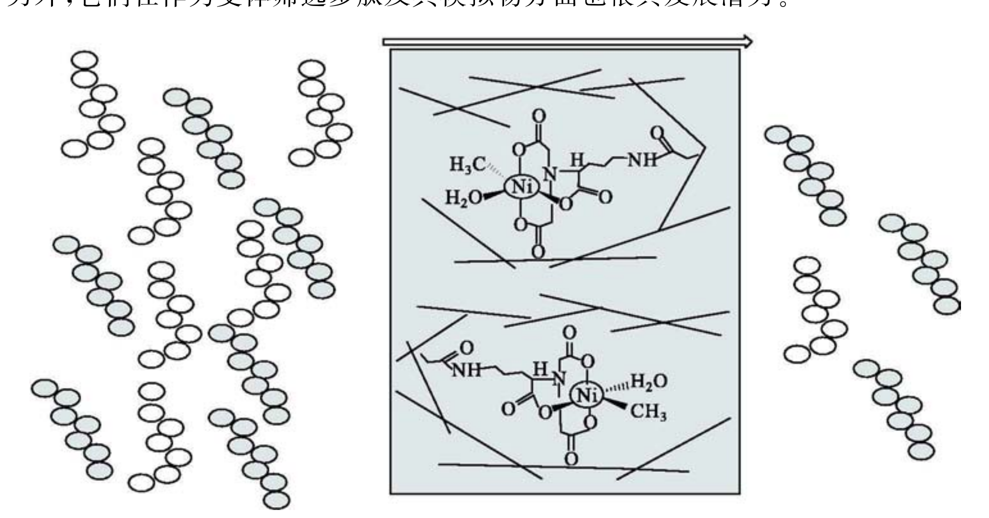


图7.27　人工运输多肽过程[88]

7.8.3　人工模拟酶

催化剂在化工生产中起着至关重要的作用，化学合成反应的发展很大程度上依赖于催化剂的品质。自然界中的酶以其高效、专一、反应条件温和的特点成为一类重要的催化剂。但天然酶提取困难、耐受性差、难以回收和重复使用的缺点严重制约了它们的生产和应用。将天然酶的催化原理运用到合成催化材料的设计中是

一种极具创新性和发展潜力的思想。其实,很久以来,人们就梦想着能够生产像天然酶那样高效专一的新型催化剂,即模拟酶(enzyme mimics),因此,人工模拟酶的研究是生物有机化学的重要研究领域之一。

在众多的模拟酶中,抗体酶的出现和快速发展使人们能根据酶催化理论设计更复杂的模拟酶,为人类自己设计新型催化剂打开了一条新的途径,使酶制备人工化的发展得以在新的平台上展开。以酶的催化理论即稳定过渡态理论为指导,通过生物体免疫系统诱导产生具有过渡态结合部位的抗体,抗体表现出很高的催化活性,称为抗体酶。但由于在抗体酶制备中采用的是通过人工设计合成或人工筛选的半抗原,且产品的最终获得仍需要借助生物体,因此,虽可按人的意愿设计酶,但仍保留了天然酶的属性和需要分离纯化等局限。抗体酶的成功实践证明印迹某一反应的过渡态,产生与之互补的过渡态结合部位,可以选择性地催化此反应。

类似于抗体酶,分子印迹技术产生了新的机会,它可以形成类似于酶结合部位的印迹空腔,因此,通过分子印迹技术人们可以模拟并深入了解复杂的酶体系。Ledonhardt 等[89]率先提出了以分子印迹方法制备"人工抗体酶"的思想,他们利用硝基苯-甲基-磷酸酯为模板制备得到分子印迹聚合物,并将其用于硝基苯乙酸酯的水解(图 7.28)。结果显示出,制得的 MIP 加速了水解过程。该方法既引用了抗体酶通过底物过渡态类似物获得催化体系的思路,又利用了分子印迹技术实现了在高分子基质上构筑识别、结合、催化洞穴,模拟天然酶的活性中心,可以说是催化抗体人工化的一条重要途径。将天然酶的催化原理运用到合成催化材料的设计中是一种极具创新性和发展潜力的思想,但对分子印迹技术来说,人工模拟酶也是最困难和最具挑战性的应用研究。如何利用此技术来模拟复杂的酶活性部位,使其最大限度地与天然酶相似是分子印迹技术面临的最大挑战。要想制备出具有酶活性的分子印迹酶,选择合适的印迹分子是相当重要的。

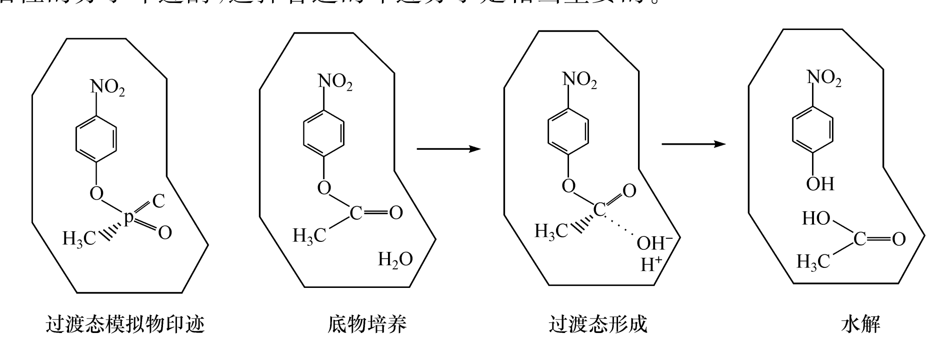


图 7.28　过渡状态模拟物分子印迹聚合物的水解作用

目前,研究较多的 MIP 模拟酶催化反应主要有水解反应、脱氟化氢反应、合成反应、氧化-还原反应等,所选择的印迹分子主要有底物、底物类似物、酶抑制剂、过

渡态类似物以及产物等。1993 年，Beach 等[90]成功完成了催化 4-氟-4-(对-硝基苯基)-2-丁酮的脱氟化氢。1996 年，Matsui 等[91]成功完成了催化 C—C 键形成的缩合反应。1997 年，Wulff 等[92]又使催化羧酸酯水解的效率提高到自发水解的 100 倍。但与抗体酶相比，模拟酶催化效率还很低，其中原因之一是底物分子在大块的印迹聚合物中扩散很慢，引起了慢的催化动力学，从而降低了酶活性。于是余建华等[93]利用在分子印迹模拟抗体酶内加入金属离子(Co^{2+})和嵌埋纳米材料(ZnO)构筑“纳米通道”的方法合成了新型的分子印迹模拟抗体酶 MIP-3，并进行了催化羧酸酯水解的动力学研究。研究发现，MIP-3 不仅具有很好的结构选择性，而且催化羧酸酯水解的能力大大提高。其催化性主要来自模拟酶孔穴中设计合成的可与底物过渡态结合的功能基，而选择性则主要来自合成模拟酶时所选模板分子在高分子体系上构筑的三维孔穴的结构。纳米材料不仅缩短底物进入模拟抗体酶印迹洞穴的时间，而且增加了模拟酶的比表面积，具有良好的通透性，可克服由扩散引起的慢的催化动力学，为合成分子印迹模拟抗体酶和纳米材料的应用提供了新途径。Li 等[94]直接以底物高香草酸(homovanillic acid，HVA)为印迹分子成功合成了模拟天然过氧化物酶，形成了血红素(hemin)的催化中心，制得的模拟酶的催化活性类似于天然酶。血晶素特殊的结构以及多重作用位点解决了分子印迹聚合物在极性溶液中识别印迹分子时所存在的困难。与天然酶相比，该模拟酶具有对 HVA 较强的识别能力、高的催化活性和对底物高的特异性以及稳定性好、可重复利用等优点，在工业上具有很大的发展潜力。

生物印迹酶也是分子印迹技术发展中非常重要的内容。它是指以天然生物材料(蛋白质、糖类物质等)为骨架，对一些酶的配体和底物、抑制剂、过渡态类似物等进行分子印迹，制备生物印迹酶。所选择的蛋白质不限于有活性的天然酶，也可用无活性的普通蛋白质(如 BSA 等)。利用蛋白质等为骨架印迹酶的活性中心使生物印迹酶更接近天然酶。生物印迹原理与分子印迹相似，只是用生物大分子代替了聚合物，在非水相中有较好的应用。因为印迹分子与生物大分子在水溶液中相互作用产生的构象变化所得到的高活性状态在移入非水相后可被保持。

生物印迹酶的制作即将酶溶于含有其配体的缓冲溶液中，使其构象发生改变，从而有利于与底物结合，再将此酶液冷冻干燥形成酶粉，用有机溶剂(常为无水乙腈)冲洗冻干酶粉去除配体后，将其过滤并真空干燥，溶在无水或微水有机溶剂中。这是由于酶在有机溶剂中具有刚性构象，在水中印迹效应即消失，印迹酶在有机溶剂中对新构象的记忆时间相当长。目前，人们利用生物印迹酶技术获得了高效的有机相催化印迹酶以及水相生物印迹酶。

多年来，化学家们试图制备出与酶的催化性能相近的化学催化剂，但进展十分缓慢。分子印迹技术为高效人工酶催化剂的开发带来了新的生机，MIP 在催化和有机合成领域中的应用日益广泛。虽然从反应速率来看，效果还不理想，但其反应

的选择性却是相当高的。这类材料还可以用于非天然酶催化的反应和相对恶劣的环境中。因此，进一步的研究工作将主要集中在开发具有结构适应性的 MIP 模拟酶上，改变刚性聚合物的被动低效的识别过程，实现诱导组装和对底物的主动捕捉；采用复合方法筛选基质，提高催化性能；减小印迹聚合物粒子尺度，获得具有均一结合位点分布的可溶性催化剂；拓宽应用领域，挖掘其在引导不对称催化和定位反应方面的潜力。可见，对酶的人工模拟是分子印迹技术最富挑战性的研究。

7.8.4　仿生传感器

特异识别现象在传感器技术中扮演了一个十分重要的角色。化学或生物传感器都是由分子识别元件和信号转换器（如电极、光极、场效应晶体管、压电晶体、热敏电阻等）所组成，它们将对分析物的应答信号转变成输出信号。近几十年来，用于环境检测、生物医疗、食品分析等的传感器都是以生物分子（如酶、抗体）作为特异识别元件，而且其突出的灵敏度和特异性引起了广泛的关注，使传感器技术的研究不断升温。然而，由于生物分子物理化学稳定性差，使生物传感器的实用化和商业化受到极大的限制，从而导致人工受体得到广泛重视。分子印迹系统的优越之处在于它的特异识别位点是根据印迹分子“量身定做”的，并且同时引入了固相聚合支撑物，这就使分子印迹材料较生物敏感材料具有很多优点：如专一性强，不需使用动物，可大规模生产，耐高温、高压、酸、碱和有机溶剂，不易被生物降解破坏，可多次重复使用，易于保存等。因此，MIP 用作传感器的敏感材料成为分子印迹技术的一个重要研究方向。我们把这种以 MIP 作为敏感材料的传感器器件称为分子印迹聚合物传感器（MIP-传感器）。通过 MIT 合成的 MIP 即为一种有效的分子识别系统，制备过程中获得的识别位点具有类似抗体-抗原体系的亲和力和选择性[95,96]，所以又被称为“模拟抗体”。科学家因此实现了不依赖生物活体而获得“抗体”的宿愿。MIP 膜传感器已被广泛用于氨基酸衍生物、生物毒素、农药、药物、体液生化、小分子肽和蛋白质、溶剂等的检测。将 MIP 作为传感器的敏感部件，然后通过各种电、热、光、质等手段转换成可测信号，可定量分析各种小分子有机化合物（图 7.29）。目前，MIP 主要应用于电化学式、光学式和质量式 3 类传感器。

将 MIP 引入电化学检测系统中，当 MIP 与溶液中的待测分子结合后，电极的电信号会发生改变，从而实现对待测物的检测。1987 年，Tabushi 等[97]首次用表面模板印迹的方法制得传感器。他们将十八烷基甲硅烷与接到其中的正十六烷一起共价键合到二氧化锡电极上，萃取出正十六烷模板分子后，活性的二氧化锡层在吸收有长、薄疏水链的客体分子如维生素 K_1、K_2、E 时，表现出很强的电化学响应，这是利用 MIP 制备传感器的第一例。Kriz 等[98]用一种琼脂糖固定分子印迹聚合物制作了一种竞争性电流型吗啡传感器，即首先将制备好的印迹聚合物作为识别

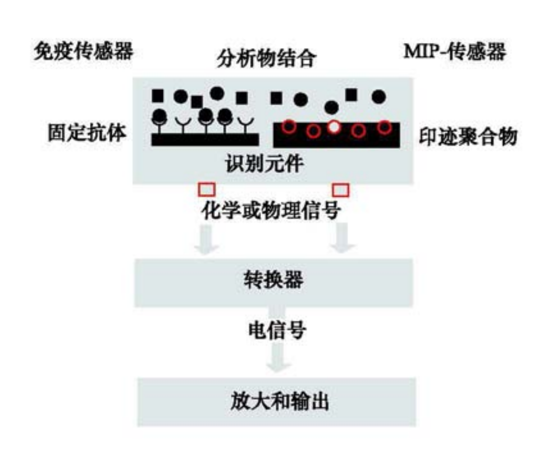


图 7.29 免疫传感器与 MIP-传感器识别过程比较

元件选择性结合吗啡,然后加入过量的电非活竞争剂可待因(codeine),将在竞争结合的作用下释放出的吗啡用安培法检测。Panasyuk 等[99]首次将 MIP 膜应用到电容型化学传感器上,该传感器的制备过程如下:首先在金电极表面由巯基苯酚自组装形成亚表层,然后在模板分子苯丙氨酸的存在下,通过循环伏安法在修饰电极表面电聚合苯酚,而后用链烷硫醇填补聚合物层的缺陷,最后洗脱模板分子得到厚约 16nm 的 MIP 膜。此电极与饱和甘汞电极(SCE)组成测定苯丙氨酸的电容型传感器,聚合物层的绝缘性能由电化学阻抗曲线表征。当溶液中加入苯丙氨酸时,传感器的电容减小,根据电容的变化实现模板分子的定量检测;而加入色氨酸、苯酚和 4-羟基苯基甘氨酸时,传感器只有微弱响应。Kubo 等[100]以除草剂莠去津为模板分子,以甲基丙烯酸为功能单体,在金电极表面制备了莠去津分子印迹聚合物受体层,实验中他们将 LiCl 作为电解质引入到聚合物中,从而使莠去津分子的还原电位在 pH3.0 时降到了−800mV(*vs* Ag/AgCl)以下,阴极峰电流与其浓度在 1～10μmol · L^{-1}范围内成线性关系。研究结果表明,所得的人工受体修饰电极对印迹分子莠去津显示出了较好的电化学选择性响应,而对其他结构相似的除草剂几乎没有响应。Ramanavicius[101]用牛白血病毒(*gp*51)印迹的 MIP(抗牛白血病毒)成功地研制出了一种新型安培免疫传感器,实现了较大分子牛白血病毒的印迹及非标记。Kitade 等[102]采用两步溶胀法在铂电极上制备出了复合胺的人工抗体。他们以胞质聚合物为敏感元件成功制备了一种检测血液中复合胺的新型电位型免疫传感器,对其表现出了高的选择性响应,并用于临床诊断。电化学检测方法灵敏度高、仪器成熟、应用广泛,MIT 与之结合,提高了方法的检测特异性。进一步完善电极 MIP 敏感层的制备技术,MIP 电化学传感器将最有希望成为一种可以普遍推广的检测手段。

压电石英晶体也称石英晶体微天平(quartz crystal microbalance, QCM),对

其表面的质量变化非常敏感。质量的增加使 QCM 的谐振频率降低,通过监测频率的变化可测定 QCM 表面吸附质量。QCM 作为转换器广泛应用于传感器技术中,将 MIP 与 QCM 结合,构成能够高灵敏检测特定分子的 MIP-QCM 传感器逐渐成为研究的热点。Kobayashi 等[103]以咖啡因为模板,聚丙烯腈为聚合剂,采用相转化沉淀法制备出了厚约 0.1mm 的 MIP 膜,将膜贴在石英晶体的金电极上,组成测定咖啡因的 MIP-QCM 传感器,对咖啡因具有较好的选择性响应。Tan 等[104]以氨基比林(aminopyrine,AP)为模板,通过热聚合制备直径约 1μm 的 MIP 颗粒,将颗粒悬浮于含聚氯乙烯粉末的四氢呋喃溶液中,铺展于 QCM 银电极表面,四氢呋喃挥发后在银表面形成 MIP 膜。用此传感器测定 AP 标准溶液,约 40min 达到稳定响应,响应范围为 $5.0\times10^{-8}\sim1.0\times10^{-4}$ mol · L^{-1},检出限为 2.5×10^{-8} mol · L^{-1}。结果发现,AP 的结构类似物 4-乙酰氨基比林和烟碱不干扰其测定。Cao 等[105]在修饰乙烯基单分子层的 QCM 金电极表面采用紫外光聚合法合成 MIP 膜,制作对L-丹酰苯丙氨酸对映体敏感的对映体选择性 MIP-QCM 传感器,检出限为 5mg · L^{-1},检测范围为 5～500mg · L^{-1},10min 内频率响应达到稳定。Dickert 等[106]以酵母细胞或病毒为模板,预先在 QCM 电极上覆盖一层功能单体和交联剂混合液,待溶剂挥发后,采用印章技术将膜板压在聚合物涂层上,紫外线照射固化,用热水洗去模板,成功构建了活体酵母细胞(yeast)的 QCM 传感器,实现了浓度在五个数量级以上的微生物在水中的在线检测。在增长介质中,该传感器检测细胞的灵敏度高达 21g · L^{-1},在流动条件下甚至能够检测到细胞碎片。Tai 等[55]利用抗原决定簇印迹法在 QCM 芯片表面合成了登革热病毒蛋白(dengue virus protein)印迹聚合物,实现了该病毒蛋白质的直接定量测定。

光化学型 MIP-传感器的研究虽开展较晚,但因有较高的灵敏度,很快引起了研究者的关注。1995 年,Mosbach 等[107]发展了一种基于分子印迹技术的光纤传感器装置,具有手性识别能力,能识别荧光标记的氨基酸衍生物。其原理是当荧光标记的氨基酸结合到附着于石英窗上的 MIP 时,荧光信号随着浓度变化。以 D 型的氨基酸衍生物做参比便实现了手性,但响应时间需要 4h。Levi[108]报道的用于检测氯霉素的分子印迹聚合物分光光度型传感器,具有良好的准确性和很强的抗干扰能力。Jenkins[109]发展了用于检测神经毒剂梭曼的分子印迹聚合物磷光型传感器,具有高灵敏度和很强的抗干扰能力。Jenkins[110]将印迹分子同荧光染料一起印迹到 MIP 中,然后与荧光检测器结合做成传感器,当水溶液中有印迹分子存在时,聚合物中的荧光即淬灭,由此检测水溶液中的印迹分子。另外,Rachkov[111]将 MIP 修饰的光纤和光纤阵列作为光纤传感器,用于测定环境水体中的有机磷杀虫剂。Microsystin-LR 是淡水蓝藻细菌(cyanobacteria)产生的一种广泛传播的、危险的毒素,在世界一些地方曾经报道自来水厂含有该毒素的污染,所以急需发展一种简便、快速、耐用和便宜的检测技术。Cranfield 科学家 Piletsky[112]利用分子

印迹技术合成了 Microsystin-LR 受体，在经过计算机对 MIP 模型优化后，所制备的 MIP 既能用于 Microsystin-LR 的抽提分离，也能用于光电传感器，组成了一个良好的分离检测系统。该系统的传感器检测毒素的下限为 0.35nmol · L^{-1}，而分离器可以将样品浓缩 1000 倍，这种能力优于淡水中 Microsystin-LR 的检测标准。

化学发光法（chemiluminescent，CL）灵敏度高且设备简单，在很多领域得到应用，但因为选择性的原因，一般用在柱后检测中。将 MIP 与 CL 结合，提高 CL 的选择性，可望开发出能用于直接检测的 MIP-CL 传感器。Lin 等[113]利用金属离子络合物的催化特性设计了检测邻菲咯林的 MIP-CL 传感器。将邻菲咯林、乙酸铜和 4-乙烯吡啶溶于甲醇中，加入交联剂和引发剂，热聚合得到蓝色聚合物颗粒，将此颗粒装入石英流通池中，结合流动注射技术，构成 MIP-CL 流通传感器。传感器中的 Cu^{2+}-邻菲咯林络合物对 H_2O_2 的水解具有很强的催化作用，水解过程中与 Cu^{2+} 络合的邻菲咯林被氧化，产生激态分子，发射出最大波长在 445～450nm 的光波，通过光电倍增管测定光的强度，可计算出邻菲咯林的浓度。光学传感器的信号通过光纤传输，损耗较小，容易实现远距离检测，因此 MIP 光学传感器具有一些与前两类传感器不同的优势[114]。

由于 MIP 传感器具有化学传感器的特性，在稳定性等基本性能方面优于生物源的同类酶传感器。还可将 MIP 固定在场效应晶体管里，当印迹分子集合到 MIP 上时，MIP 构象的变化导致了晶体管电容的变化，从而将化学信号转化成了可检测的电信号。

由此可见，分子印迹是生物模拟聚合识别位点或“模拟抗体/受体”的制作技术，其稳定性远远高于天然生物识别元件，是解决生物传感器稳定性差的新途径。而且它能够制备出具有高度底物选择性和特异性的识别基质，同时具有简单的制备程序。目前，分子印迹聚合物作为传感器识别元件在化学品和药物的生产、医学和药理研究、环境检测、国防等领域展现出了良好的发展前景，有望成为生物材料的理想替代品。

随着分子印迹技术的研究不断深入和应用领域的扩展，人们越来越清楚地看到这项技术广阔的应用领域和重要的理论意义。如对酶的模拟的研究，其意义远不止酶的制备和可以催化的反应，更为重要的是我们还可以发现催化的机制，从而认识生命自身的化学过程和生物学过程，解决诸如寿命的延长、疾病的治疗等一系列重大问题。

然而，人们虽然在分子印迹技术的应用研究过程中已经取得了一些成果，但还有很多问题需要解决：首先，所用的功能单体的种类太少，限制了这项技术的应用；第二，模板分子都集中在小分子化合物上，对于生物分子，尤其是对糖、蛋白质，甚至整个细胞的研究发展缓慢；第三，在水相中制备分子印迹聚合物，并在水相中识别底物的研究较少，而生物酶发生作用的环境都在水相中；第四，对印迹聚合物和

模板分子作用的机制认识较为肤浅，对它们的热力学、动力学的研究也较少。所有这些有待解决的问题限制了分子印迹技术应用范围的扩大。但我们坚信，随着化学、生物学、材料学和分析技术的不断进步，经过科学家们的不懈努力，这些问题都会逐步得到解决，而分子印迹技术也将在分离、模拟抗体受体、生物传感及模拟酶催化等许多领域发挥越来越大的作用。

7.9　分子识体

随着分子生物学和基因工程的迅速发展，人们对核酸的研究已经相当深入。受组合化学、抗体库和随机噬菌体肽库技术的启发，1990 年，美国的 Szostak 和 Gold 等[115]实验室各自独立地建立核酸文库，并逐步发展成一种能从超过 10^5 个核酸分子文库里筛选出与配体高效、专一结合的 DNA 或 RNA 片段的指数富集的配基系统进化（systematic evolution of ligands by exponential enrichment，SELEX）技术。筛选出来的 DNA/RNA 寡核苷酸被称为核酸识体（aptamer，也译为核酸适体、适配子）。核酸识体一般由 20～60 个碱基组成，能特异性地结合蛋白质、多肽、有机物、金属离子等各种配体，具有较小的解离常数（10^{-9}～10^{-12} mol · L^{-1}）[116]。核酸识体的出现，冲破了传统意义上关于核酸只是遗传信息存储和转运载体的认识，为蛋白质的特异性分析提供了新的生命分析材料。利用核酸结构的多样性，可使其与各种配体产生高选择性的结合，实现类似抗体的分子配体或分子探针的功能。由于核酸识体具有靶分子广、亲和力高、特异性强、易改造修饰、易合成、易存储等特点，它在基础研究及生物物质的分离分析、药物开发、医学诊断和治疗、生物传感器、分子开关等方面的应用引起了人们的极大兴趣[117～119]。

7.9.1　核酸识体的筛选——SELEX 技术

SELEX 技术是分子进化工程技术的一种，其基本思想是利用体外化学合成一个单链寡核苷酸库，用它与靶物质混合，形成靶物质-核酸的复合物，洗掉未与靶物质结合的核酸，分离与靶物质结合的核酸，以此核酸分子为模板进行 PCR 扩增，再进行下轮的筛选过程。通过重复的筛选与扩增，最后即可得到高亲和力与高特异性的核酸识体。

1. SELEX 技术的筛选基础

核酸分子在一级结构上存在着核苷酸大量且不同顺序的排列组合。随机寡核苷酸的多种空间结构是 SELEX 技术的筛选基础，多达 10^{14} 以上的随机寡核苷酸几乎涵盖了所有可能的立体构象，可作用于自然界存在的几乎所有种类的分子。随机寡核苷酸能通过“假碱基对”的堆积作用、氢键作用、静电作用等在特异位点如

发卡、口袋、假节、G-四聚体等结构处与其他分子如蛋白质、核酸、其他有机物，甚至金属离子等或嵌合，或包被，形成具有高特异性结合力的稳定复合物[120]。利用合成化学可以将一定长度的核苷酸的不同组合都合成出来，构建成一个包含这一长度核酸分子所有可能突变的文库，这样就可以在试管里模拟大自然的进化，有目的地施加选择压力，在很短的时间里筛选出符合特定要求的核酸分子。

2. 构建寡核苷酸文库

利用分子生物学技术，构建人工合成的单链随机寡核苷酸文库，其中随机序列长度在 20～60 个碱基左右，随机序列两端是带有限制性内切酶位点的固定序列，此固定序列是多聚酶链反应及其他酶学反应相关引物的结合位点。随机寡核苷酸库可以是 RNA 文库，也可以是单链 DNA 文库，DNA 或 RNA 随机序列库的复杂性或多样性取决于核苷酸数目。理论上，40 个核苷酸的随机组合库应有 1.2×10^{24} 个单独序列，库容量明显高于其他组合化学库。为了提高识体的稳定性，增加其功能多样性及生物利用度，可以对寡核苷酸进行化学修饰，构建各种不同的 SELEX 修饰基团文库，如抗核苷酸酶修饰基团，有利于识体复制、扩增的修饰基团，结构类似物修饰基团等。

3. 特异识体的筛选与扩增

用上述文库中的随机寡核苷酸序列与抗原或药物等靶分子混合并相互作用后，用洗脱、过滤、亲和色谱、磁珠等方法筛选出与靶序列结合的寡核苷酸识体。候选序列的 DNA 片段和 RNA 片段，可分别通过 PCR 和 RT-PCR 扩增，再开始下一轮筛选。随着每一轮筛选严谨度的不断增加，与靶分子高度特异结合的 DNA 或 RNA 分子呈指数增长，低亲和力序列逐步被淘汰，约经 8～15 轮筛选后可达到亲和饱和度，PCR 扩增产物即用于克隆、测序。通常情况下，最后一轮富集候选库中 90%以上的序列都是能与靶分子特异结合的识体。初步筛选出的识体，可作为先导分子进行优化，包括寻找能发挥功能作用的最小核心序列、根据目的进行化学修饰、研制最佳识体。

下面以 RNA 随机库为例来说明 SELEX 技术筛选全过程。如图 7.30 所示，首先用自动固相合成法建立一个碱基数为 n 的随机 DNA 文库，则文库含有数目为 4^n 的不同 DNA 序列。这些 DNA 序列的两端为固定的引物序列，5′端引物里包含一段 T7 启动子序列，可被 T7RNA 聚合酶识别，并转录为随机 RNA 文库。RNA 随机库在特定缓冲体系和温度下与靶分子温育，此步中仅有极少数序列能与靶分子结合，可通过物理的方法分离出结合序列。如靶标是蛋白质分子，通常用硝酸纤维素膜截留与靶蛋白结合的核酸序列，或预先用生物素修饰靶蛋白分子，再用表面包被有链亲和霉素的磁珠捕获核酸-蛋白质复合物。对于小的靶分子，预先将

其固定在固相支持物上制成亲和基质，这样通过简单的洗脱步骤即可分离结合与非结合的核酸序列。分离出的结合序列经 RT-PCR 及体外转录再生成次一级候选库，与原靶分子温育，进入第二轮筛选。随着筛选严谨度（温度、pH、金属离子、靶分子浓度、温育时间等）的不断增加，低亲和力序列逐渐被淘汰。然后继续循环进行相同的步骤，在每轮筛选的同时，设立平行的亲和力检测实验，随筛选轮数的增加（约 8～15 轮），寡聚核苷酸与靶分子的亲和力逐渐增强，解离常数 K_d 逐渐下降，最后得到亲和力和特异性很高的核酸识体。将筛选得到的产物克隆入载体，并将选出的克隆进行测序和结构分析，可以获知高亲和力寡聚核苷酸的序列和结构特征。

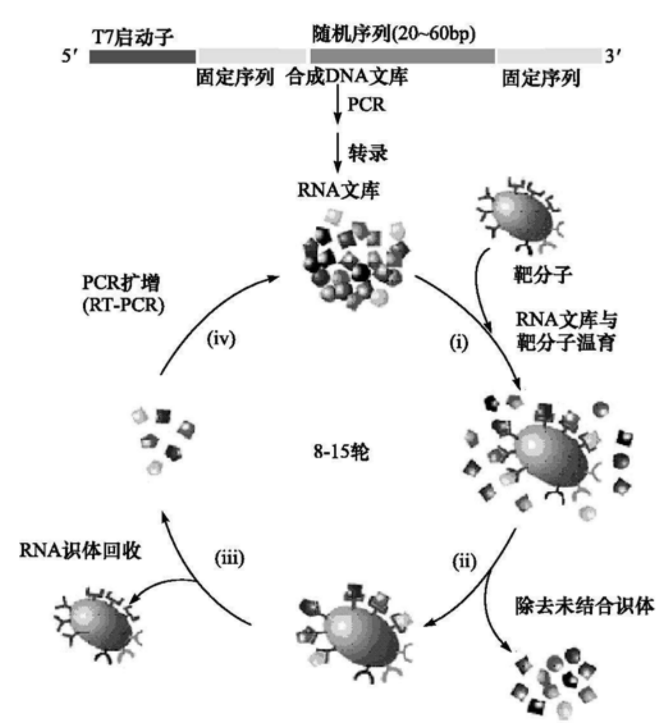


图 7.30　SELEX 筛过程示意图

4. 影响 SELEX 过程的因素

影响 SELEX 筛选结果的主要因素是每种靶物质识体分离的有效性。单链 RNA 在 SELEX 过程中易被核糖酶分解，不容易得到特异性识体。PCR 扩增条件也影响着筛选过程，复性温度的高低直接影响产物的分子质量。此外，识体筛选所需的循环次数由每一轮筛选条件的严格程度及靶分子的自身属性所决定，通常确定为最后一轮筛选的客观条件是洗涤缓冲液中不能再有扩增产物即可[121,122]。一

般筛选轮数为 8～15 轮，轮数少，可能得不到高亲和力的识体；轮数多，浪费时间、人力与物力。

7.9.2　核酸识体的优越性

核酸识体代表着一类功能与抗体类似的新型分子。随机寡核苷酸文库，特别是随机 RNA 文库，与现在常用的蛋白质、多肽以及合成的小分子有机化合物库相比，具有如下优点。

1. 作用的靶分子范围更广泛，与配体的亲和力更高

它对靶分子无要求，可以说自然界中存在的所有物质（金属离子、有机分子、核酸、多肽、蛋白质、细胞、细胞聚集体、亚细胞器、大分子聚合物、新鲜分离的整块组织或体外培养的组织等）理论上都可以通过 SELEX 技术筛选到其相应核酸识体[123]。通过反向 SELEX 技术，在不知靶分子性质的情况下也能筛选到其相应识体。已有研究报道了以大鼠脑胶质瘤血管内皮细胞为靶分子筛选出 25 种核酸识体后，再以正常内皮细胞为背景过滤掉相应的结合序列，淘选出了一种仅识别肿瘤血管内皮细胞的核酸片段。对毒物介质或新变异的病毒蛋白的鉴别诊断，单克隆抗体无法胜任，却可以直接利用 SELEX 技术筛选出它的特异核酸识体作为诊断试剂，或经过改造用于预防与治疗。这一点在当代军事医学（化学战、生物战）及流行病学研究中将会有重要价值。筛选出的核酸识体与靶分子的结合能力极高，解离常数多在 10^{-9}～10^{-12} mol・L^{-1}之间，高于其他类型的配体，有些甚至强于其天然配体。比较研究发现，细胞内天然 DNA 或 RNA 与蛋白质结合的相关基序的组成与排布常偏离了在识体中所观察到的最佳组合[124]，可能的原因是：与核酸识体承受的单一人工进化压力不同，天然核酸在亿万年中受到了网络式的复杂进化压力，它们与蛋白质的结合只是手段，发挥功能才是最终目的。角化细胞生长因子（keratinocyte growth factor, KGF）与其核酸识体结合的解离常数竟高达 300fmol・L^{-1}（0.3×10^{-12} mol・L^{-1}），是迄今为止亲和力最高的识体对。Jiang 等[125]用原子力显微镜直接检测并比较了 IgE 与其识体（37-nt）、IgE 与其单克隆抗体的相互作用，用 Possion 分析法统计解离单个复合物分子所需的能量证实：核酸识体与其靶蛋白的亲和力可与单抗和抗原的结合相媲美，甚至强于单抗与抗原的作用。

2. 与靶分子结合的特异性更强

寡聚单链 DNA 或 RNA 形成多种热力学稳定的三维空间结构，是其与靶分子特异高效结合的基础。在大多数情况下，溶液中的单链 DNA 或 RNA 的空间构象是不确定的，当靶分子存在时，单链 DNA 或 RNA 可发生适应性折叠，形成发夹（hairpin）、假结（pseudoknot）、凸环（bulge）、G-四分体（G-quartet）等特殊三维空间

结构。决定这些结构的碱基往往是与配体结合的重要位点。采用核磁共振及 X 射线衍射等手段可以从结构上对核酸识体与配体的作用机制进行较为深入的研究。从对获得的一些高分辨的核酸识体与配体复合物的三维结构研究中发现核酸识体与配体主要通过“假碱基对”的堆积作用、氢键作用、静电作用和形状匹配作用等产生高特异性的结合力[124]。

“假碱基对”的堆积是指配体的芳香环部位与核酸分子的碱基平面平行并有重叠,类似于核酸分子里的碱基堆积作用。这种碱基堆积作用使核酸识体与配体之间有较大的接触面积(30～40nm^2),能够分辨出靶分子结构上细微的差别,形成了识别的高度特异性。如茶碱分子中的芳香环能与其核酸识体分子里的碱基重叠[126](图 7.31),但茶碱分子 7-N 上的 H 被甲基取代后(即咖啡因),这种平行关系被破坏,能结合茶碱的核酸识体就不能识别咖啡因分子,亲和力相差 10^4 倍,而常规的茶碱单克隆抗体检测二者时有交叉反应。Rhie 等[127]证实了一种 2′-氟 RNA 型识体(SAF-93)能识别朊病毒蛋白的两种构象 PrPsc(具有感染性)和 PrPc(正常蛋白因子),并抑制后者向前者的转化。手性药物是新药开发的发展主流之一,精确区分并获得手性分子的两种不同镜像形态极为重要,美国药典已将同一药物的对映体和消旋体分列为两种药物,并要求各自描述其药理作用。Michaud 等[128]将特异结合 D-精氨酸升压素的 DNA 型识体固定在层析支持物上,可以成功滞留流经柱子的 D-肽并将其与 L-肽分开。最近,他们又将识体的这种用途扩大到腺苷等生物小分子镜像体的分选上[129]。另外,通过反向 SELEX 筛选,可以有效减弱以致消除既能与靶分子结合,又能与靶分子类似物结合的寡核苷酸识体,从而筛选出高度特异结合靶分子的寡核苷酸识体。

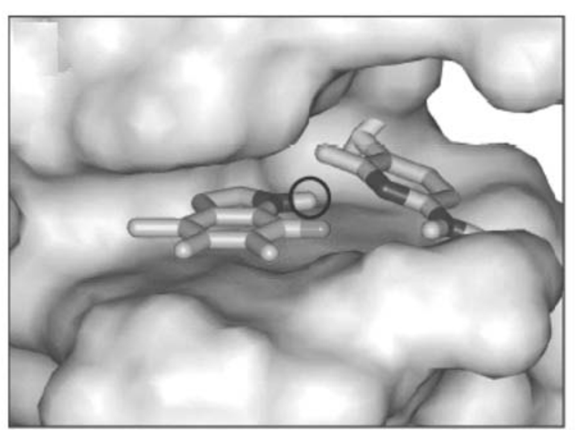


图 7.31　茶碱-RNA 识体[130]

3. 异质性程度更高，筛选周期更短，无毒性

随机寡核苷酸文库中随机区的每个核苷酸位置都存在 4 种可能性，理论上如果寡核苷酸中的随机序列由 n 个碱基组成，库容量则为 4^n，若再考虑人为塑造的修饰文库，就更增加了随机序列的多样性。目前，SELEX 实验常用的寡核苷酸随机序列长度一般为 30 个碱基，库容量可高达 10^{18}。生物体系来源的文库如噬菌体展示肽库，由于受到编码肽的基因偏性、大肠杆菌转化效率等限制，其库容很难超过 10^9；其他小型有机分子库因为合成目的各异或合成技术本身存在瓶颈而库容量更小。文库的容量对于能否筛选到高亲和力的配体至关重要。

另一方面，抗体在如今的临床诊断分析中扮演着非常重要的角色。但是，抗体的蛋白质本质决定了它容易变性的特点，而核酸识体冻成干粉后可于室温保存数年，适当溶解后又立刻恢复其功能构象；抗体蛋白的异源性很难克服，但至今未有资料显示识体具有任何免疫原性或毒性；制备单克隆抗体至少需要 3～6 个月，且成本昂贵，而 SELEX 筛选周期一般为 2～3 个月，最快 2 周。目前 SELEX 筛选已实现自动化，进一步提高了生产效率，降低了成本。如 Mendonsa 等[131] 报道，当 SELEX 技术与毛细管电泳技术联用时，只需要几天时间就可筛选出针对靶分子高亲和力与高特异性的寡核苷酸识体。因此，随着 SELEX 技术的发展，核酸识体将有可能取代天然抗体和其他受体分子而应用于生物医学等领域。

4. 筛选过程体外进行，易于修饰，组织穿透能力强

核酸识体的筛选完全在体外进行，具有时间、质量和数量上的选择弹性，可以在合成时精确、定点、随意连接其他功能基团和标记物（如荧光标记物），且不涉及任何动物和细胞，当面对免疫原性差或有毒的靶分子时优势更明显。核酸识体分子质量适中，组织穿透能力强，有望直接运用于活体分子成像和药物传输，亦适用于细胞内诊断。

7.10　分子识体的应用

如前所述，核酸识体以其独特的优越性能很好的弥补抗体的不足甚至能取代抗体成为新一代的分子识别与调控工具。由于 SELEX 技术可在试管里模拟自然的大规模进化，有目的地施加压力筛选产生高质量的核酸识体，且可根据其亲和力与识别位点选择性地调节核酸识体的功能和靶分子的生物活性，所以为许多具有重要生物医学价值的生物靶分子的检测、定位以及其生物功能的调控提供了强有力的手段。虽然 SELEX 技术的研究应用目前依然在初期阶段，但它的进展非常惊人，已在分析应用、药物开发、医学诊断与治疗、分子开关等方面显示出了广阔的

应用前景。

7.10.1　分析应用

1. 分子识体生物传感器

目前基于抗体诊断的技术几乎都可以由分子识体来替代。将生物分子如蛋白质、核酸作为感受器，是当代生物传感器发展的主流。抗体介导的免疫传感器重复使用受限，且需温和条件以避免破坏抗体功能；核酸识体却可以在不同温度、不同离子浓度以及金属螯合剂存在等条件下反复变性和复性，可修饰和固化，容易标记报道基团，这使核酸识体成为理想的传感器探测元件。目前，核酸识体作为传感器探测元件已成功地与电化学、光学、力学等换能器联用，组成了多种新型蛋白质分析检测的生物传感器，并进一步向微阵列方向发展，形成了一个能适合于多种类型物质分析的新型生物传感器的发展方向。

1）电化学识体传感器

电化学识体生物传感器是由固定了分子识体的电极构成。首先在适当的温度、pH 和离子强度条件下将分子识体固定到电极表面，将待测物加在电极表面，与分子识体作用，从而导致电极表面结构的变化，然后通过检测电极表面电信号达到识别和鉴定靶物质的目的。

Ikebukuro 等[132]研究了以凝血酶为检测目标的凝血酶识体电化学传感器。他们选取分别作用于凝血酶不同位点的两种识体构建一种“三明治”式的检测蛋白质模式。先将一种识体固定在金电极表面来捕获凝血酶。当加入凝血酶后，在电极表面形成识体凝血酶复合物。再加入另一种 5′端修饰吡咯喹啉苯醌葡萄糖脱氢酶[（PQQ）GDH]识体，使三者形成识体-凝血酶-识体复合物。当在此电极表面加入葡萄糖溶液后，识体上（PQQ）GDH 氧化葡萄糖形成电流信号。利用此原理对凝血酶可以实现定量检测。这种传感器检测凝血酶的最低检测限可以达 10mmol · L^{-1}，凝血酶浓度在 40～100mmol · L^{-1}时有很好的线性关系。

Hianik 等[133]将 3′端生物素修饰的凝血酶识体固定在亲和素修饰的金电极表面，以亚甲基蓝为指示剂，用循环伏安法对亲和素、生物素标记的凝血酶识体、凝血酶依次组装到金电极表面的过程进行了研究，在 −0.4～0.2V 间，电流发生明显变化并可以区分不同的组装层，并用差分脉冲伏安法研究凝血酶识体与不同浓度凝血酶的相互作用情况，最低检测限可达到 10mmol · L^{-1}。

2）光学识体传感器

根据所选光学检测原理与材料不同，光学识体生物传感器主要分为光纤式、消失波式、表面等离子共振式、荧光式等。

（1）光纤识体传感器。光纤识体生物传感器的基体为石英光纤，它的作用机制是利用石英表面先接上一层修饰物，再将识体固定在光纤端面上，然后与目的物进行生化反应，反应后产生的特征光学信号（荧光等）通过光纤探头传递至检测器，再经光电转换检测靶物质含量。

Lee 等[134]把荧光标记的凝血酶核酸识体固定在硅球上，然后将硅球嵌入光纤末端，建立了光纤微阵列传感器，并用 CCD 成像技术记录检测信号。这种传感器能在通常其他传感器无法到达或不能工作的环境下工作，比如核环境、人体内部等，且容易做成多光纤的微阵列系统，可处理多通道信号。光纤 DNA 传感器可检测杂交反应后产生的特征光信号，选择性强，易于排除杂交过程中非特异性吸附的干扰，测定准确。

（2）表面等离子体共振识体传感器。表面等离子共振（surface plasmon resonance，SPR）技术通常是将识体分子固化在以石英或玻璃为载体的金属（通常为金）膜表面。加入待测目的物后，两者的结合使金属膜与溶液界面的折射率上升，从而导致共振角度的改变。如果固定入射光角度，就能根据共振角的改变程度对待测目的物进行定量分析。传感器与传统荧光法相比，具有实时检测、无需标记、耗样少等特点。

Mori 等[135]通过 BIAcore 技术研究了与肿瘤坏死因子（TNF）受体家族中 NF-κB受体激活因子（RNAK）具有高亲和力的 RNA 识体与 RNAK 之间的相互作用，结果表明识体和 RNAK 配体（RNAKL）可同时结合在 RNAK 上，而不会产生竞争抑制。进一步实验结果表明，RNAK 识体可有效地与 TNF 受体家族其他蛋白质结合。由此可知，识体未与 RANK 上的配体结合位点结合，而是结合到 TNF 受体蛋白家族的共同相对保守区。Hwang 等[136]将生物素修饰的寡核苷酸 Oligo(dT)$_{18}$联结到链亲和素修饰的 SPR 芯片表面，再将 3′端含 18 个碱基 A 的 G9-Ⅰ识体同时杂交固定在芯片表面，用 SPR 技术及蛋白酶抑制技术研究肝炎 C 病毒蛋白 3 蛋白酶与其对应的 RNA 识体（G9-Ⅰ）的相互作用。实验表明在肝炎 C 病毒蛋白蛋白酶识体的主要区域（δNS3）的 Arg161 和 Arg130G9-Ⅰ在蛋白酶与识体的结合中发挥着重要作用。

（3）荧光识体传感器。荧光识体传感器的主要原理是利用激发光到达荧光试剂相，用检测器对荧光信号进行检测，实现对待测物的定量分析。Potyrailo 等[137]最早将凝血酶 DNA 识体 3′端进行荧光标记并共价联接到玻璃载体表面，溶液中的凝血酶可以通过标记的识体消失波诱导的荧光强度的改变被特异性地检测出来，检测时间短，检测限为 5nmol · L^{-1}，降低待测物用量和实验结果背景，在凝血酶浓度为 2～200nmol · L^{-1}时有很好的线性范围。在固定相、溶液和血液中的 K 分别是 47nmol · L^{-1}、100nmol · L^{-1}和 70nmol · L^{-1}。McCauley 等[138]利用癌症相关蛋白[凝血酶、碱性纤维原生长因子（bFGF）、动脉内皮生长因子（VEGF）、肌

苷一磷酸盐脱氢酶(IMPDH)]识体构建了蛋白质多元分析识体生物阵列传感器。他们将荧光标记的识体固定在玻璃基质上,利用荧光极化各向异性进行靶蛋白结合固相分析,解离常数 K_d 为 $15nmol \cdot L^{-1}$。该传感器在复合样品(细菌细胞溶菌液)中对靶分子表现出了高的特异性响应。

3) 压电晶体识体传感器

压电识体生物传感器的原理是石英谐振器表面质量的变化与频率的变化成负相关。固定带有分子识体的石英谐振器,当加入的待测目的物被识体进行识别并生成亲和偶合物后,将导致压电晶体的频率发生变化。此项技术不需要任何标记过程,操作方便。此类传感器包括体波式和表面声波式识体传感器。

(1) 体波式识体传感器。体波是在介质内部传播的声波,它通常采用 AT 切割石英晶体作为介质,声波沿厚度方向形成驻波,质点的振动方向与波的方向垂直,因此称为厚度剪切振动(thickness shear model,TSM)。体波模式的灵敏度与晶体的厚度有关,厚度越小灵敏度越高,一般频率范围在 5~20MHz,采用体波模式的压电传感器通常被称为石英晶体微天平(quartz crystal microbalance,QCM)。QCM 由于装置简单,得到了广泛的应用,并且已经发展出成熟的商业化系统。

Liss 等[139]应用石英晶体传感器来实时检测无标记蛋白的浓度和亲和常数,将人 IgE 作为被分析物,并比较了 DNA 识体与人 IgE 抗体作为固定分子的性能差别。实验表明 DNA 识体的专一性、亲和性与人 IgE 抗体是等同的,检测限为 $0.5nmol \cdot L^{-1}$,且固定在传感器上的识体分子可以重复使用。Hianik[133]等用 QCM 检测出凝血酶识体与凝血酶的解离常数 K_d 为 $0.17nmol \cdot L^{-1}$。Minunni 等[140]将 HIV-1 逆转录激活因子(Tat)连接到链亲和素修饰的石英金电极表面,对传感器的敏感性、专一性、重复性做了详细的研究,并且和传统的免疫传感器做了比较,发现其性能均好于传统免疫传感器。

(2) 表面声波识体传感器。至今人们已研制了多种压电传感器,如声板波传感器(acoustic plate mode,APM)、浅体声波(surface skimming bulk wave,SSBW)传感器、漏表面波(leaky surface acoustic wave,LSAW)传感器、兰姆波传感器(Lamb wave)和乐甫波(Love-wave)传感器。乐甫波传感器具有高灵敏度、低噪音、制作工艺不复杂等特点,已经成为当前生物传感器研究领域的方向之一。乐甫波是一种表面声波,是沉淀于压电基片表面的薄层声波导中传播的表面剪切横波,乐甫波的质点振动方向既垂直于波的传播方向,又垂直于基片表面,因此乐甫波器件与液体接触时能量损失很小。乐甫波传感器适用于液相测量。

Schlensog 等[141]研制了自组装膜声波传感器,将凝血酶和逆转录肽固定到传感器界面表面,凝血酶的检测限在 $72pg \cdot cm^{-2}$,逆转录肽在 $77pg \cdot cm^{-2}$,亲和常数为 $500nmol \cdot L^{-1}$。Gronewold 等[142]用乐甫波传感器研究凝血酶识体与凝血酶

的相互作用,在传感器上其解离常数与溶液中接近。声波识体传感器是一种对样品进行实时分析的非常有效的仪器,传感器表面可以重复再生使用,具有非常高的专一性,今后将逐渐发展成为高通量的药物筛选的传感器。

4)悬臂梁生物传感器

悬臂梁生物传感器是一种新型非标记蛋白检测传感器,在生物传感领域有很好的发展前景[143]。Savran 等[144]将识体作为一种可能的受体分子与这种新型换能技术相结合构建了识体悬臂梁生物传感器。他们利用巯基修饰的热菌(Taq)DNA 聚合酶识体作为该传感器悬臂梁的识别元件,用干涉测量法检测悬臂梁相对修饰有非特异序列的参照悬臂梁的弯曲程度,对分析物进行定量分析。他们利用7 次结合实验(改变 Taq 浓度)得到的灵敏度和再生情况对该体系进行表征,并通过考察系统对非特异蛋白质如凝血酶和 TaqDNA 聚合酶的响应研究了该传感器的特异性。即注入 75nmol · L^{-1} 的凝血酶没有发现明显的悬臂梁弯曲,而加入500pmol · L^{-1} 的 Taq DNA 聚合酶只发现了微弱的非特异性结合,表明该传感器具有对靶分子 Taq 的高的特异性响应。此外,该传感器在复合基体(如大肠杆菌溶菌液)中仍能保持检测目标蛋白质的能力,而大肠杆菌溶菌液在标准结合实验中能产生相当大的信号,干扰 Taq 的测定。

5)原子力显微技术

原子力显微镜(atomic force microscopy,AFM)可用来探测表面分子作用机制,将 AFM 探针的针尖以生物分子进行化学修饰,通过修饰探针与底物分子之间亲和力的不同,研究识体与抗体分别修饰在探针分子上的相互作用。Jiang 等[124]将人 IgE 识体及抗体分别修饰在 AFM 探针分子表面,研究其与人 IgE 的相互作用。结果表面人 IgE 识体对人 IgE 具有高度专一性,其亲和力可以比拟甚至超过人 IgE 抗体。由于该方法的灵敏度受表面状态及键合时间的影响,并且仪器设备价格较昂贵,使其应用受到一定限制。

6)识体微阵列传感芯片

微阵列传感器技术是近十几年来在生命科学领域中迅速发展起来的一项高新技术。它主要是指通过微加工技术和微电子技术在玻璃、硅片或塑料片等介质的表面上构建微型生物化学分析系统,以实现对细胞、蛋白质、基因以及其他生物分子的准确、快速、高通量的平行检测。高通量、并行性、低消耗和微型化是微阵列传感芯片的主要特点。在涉及识体传感器应用的大量实际问题中,所要分析的对象不仅有单一成分的物质,而且包含多种成分的混合物。解决这一问题的主要途径是发展化学传感阵列技术。所谓阵列技术就是将多个化学传感器组合在一起形成

一个测量阵列,使获取的信号从原来的单参数变为阵列检测的多参数。徐大炜等[138]应用电化学阻抗法建立了无标记核酸识体阵列传感技术。他们以人免疫球蛋白E(IgE)及其DNA识体为模型体系,将巯基修饰的识体固定在光刻蚀金阵列电极表面,通过电化学阻抗检测技术测定了识体修饰电极与人IgE两者相互作用后阻抗值的变化。研究结果表明阻抗法可以灵敏地检测人IgE,最小检测限为$10nmol \cdot L^{-1}$,实验中还将IgE/识体的相互作用与IgE/Ab的相互作用值进行了比较,发现IgE/识体相互作用的灵敏性要高于IgE/Ab的相互作用。通过进一步采用电极阵列研究不同结构的H IgE识体与H IgE的相互作用情况,结果表明IgE/识体之间的相互作用不仅与识体的结构有关,且其碱基组成也起着非常重要的作用[145]。

McCauley等[138]研究了基于芯片基础的识体阵列生物传感器来对蛋白质进行定量分析鉴定。针对四种疾病相关的蛋白质的DNA和RNA5′生物素3′FAM标记的识体被固定在亲和素修饰的玻璃载体表面,可以对蛋白质混和物样品同时进行检测。这项技术通过直接检测表达、修饰和疾病密切相关的蛋白质,有望加速癌症的诊断。Mori、Hwang等[135,136]分别应用SPR技术研究了识体蛋白相互作用的亲和性,取得了良好的效果。

尽管识体传感器的研究工作还处于起步阶段,但近几年来作为一种新兴的生物传感器得到了迅速发展,许多不同的感应元件及技术相继在识体传感器中得到了应用,从而推动了识体传感器技术以及其应用领域的研究。同时识体传感器作为一种新型的传感器,在性能的完善与应用的推广方面仍面临着许多需要继续研究的方面。推广识体传感器在临床医学诊断上的应用研究是促使此类传感器最终达到完善的目标之一。Hwang等[136]已经应用识体传感器来对肝炎病毒检测进行研究。McCauley等[138]将4种疾病相关蛋白(凝血酶、碱性纤维原生长因子、动脉内皮生长因子、肌苷一磷酸盐脱氢酶)通过识体传感器进行定性定量鉴定。未来随着越来越多的疾病相关蛋白识体通过技术被筛选出来,随着识体传感器技术的不断成熟,应用于临床检测的识体传感器将会很快问世。今后随着高通量识体传感器的研发,将会使识体传感器对疾病相关药物识体的筛选变为可能。

2. 色谱分离应用

核酸识体作为分子识别元件与分析仪器联用,尤其是作为分离技术中的固定配体具有很好的发展前景[106]。对同一手性分子的对映体结构进行分离,研究他们不同的生理行为日益引起制药学和生物学领域工作者的极大兴趣[146]。高效液相色谱比较适合此类研究,在HPLC中不同类型的手性选择物被用作固定相。目前,传统的手性选择物(如氨基酸、冠醚等)逐渐被印迹聚合物或抗体所取代,但无论是传统的手性固定相还是印迹聚合物或抗体都存在许多缺陷[121]。近几年,核

酸识体作为手性化合物及对目标分子的手性选择结合能力已有文献报道[147,148]。Michaud等[128]将55-碱基生物素DNA识体固定在链球菌(streptavidin)色谱支持物(聚苯乙烯-二乙烯基苯)上,实现了对D-缩氨酸(静氨酸-抗利尿激素)的特异性吸附。该识体曾被用来结合缩氨酸(静氨酸-抗利尿激素)的D-对映体,结合常数为1.1μmol·L^{-1},但没有发现对L-对映体的明显吸附。作者还考察了不同参数(如温度、pH及盐的浓度)对D和L型缩氨酸的保留和分离的影响,探讨了该核酸识体柱的分辨机制和最佳分辨条件。L型缩氨酸与固定相之间弱的相互作用证明了核酸识体修饰柱的稳定性和特异性。将pH7.0的流动相(含有5mmol·L^{-1}磷酸缓冲液,100mmol·L^{-1} KCl和3.0mmol·L^{-1} $MgCl_2$)在温度为20℃时流经该识体修饰柱,结果发现,D-缩氨酸滞留在亲和柱内,而L-缩氨酸随流动相流出。Michaud等[129]进一步用修饰有DNA识体的HPLC微孔柱溶解小生物活性分子(D-腺苷和L-酪氨酸酶)的对映体,发现得到的DH(D-腺苷:−71.4kJ·mol^{-1};L-酪氨酸酶:−139.4J·mol^{-1})与分析物和识体手性固定相之间形成紧密复合物时的DH相一致。

核酸识体因其高的特异识别能力在亲和色谱领域也很有发展潜力[106]。如Romig等[149]将一种L-选择素(L-selectin)识体用于了纯化人L-selectin受体球蛋白(LS-Rg)溶解蛋白质。L-selectin是一种钙依赖外源凝集素,包含淋巴细胞、单核细胞和粒细胞表面表达蛋白质。Lasky[150]认为L-selectin有助于淋巴细胞与外淋巴结上的高内皮小静脉的结合。筛选出的核酸识体可结合到L-selectin的外源凝集素结构域并抑制人淋巴细胞上的L-selectin进入人体[151]。L-selectin识体是一个含36个核苷的DNA寡核苷酸,与L-selectin形成复合物的解离常数为2×10^{-9} mol·L^{-1}。将5′生物素识体固定在链球菌修饰的树脂上,然后将其装入色谱柱进行纯化试验,结果发现,在纯化的第一步,识体修饰柱产生了1500倍的纯化,回收率为83%。

最近,Deng等[152]利用识体固定相监测活鼠脑中的腺苷。他们将生物素修饰的识体和链球菌修饰的多孔玻璃珠进行混合,然后装入熔融硅胶毛细管,进样间隔为5min,进样之后3min内对样品进行稀释,并进行UV检测,检测限为30nmol·L^{-1}。实验发现,该识体柱对200次进样的检测结果基本一致,显示出较好的稳定性。识体色谱方法的这些优点将使其逐渐取代那些昂贵而又复杂的分析方法,如HPLC-MS分析。

甲状腺信使核糖核酸形成因子1(TTF1)识体也已用于亲和色谱[153]。TTF1是脊椎动物甲状腺、肺及脑形成过程中NK同域转录因子中较有特性的因子之一[154],近年来被证明是肺腺癌初期的高特异性标志物。筛选出的生物素识体修饰在链球菌磁珠上可用于细菌溶解产物中可溶蛋白质混合物的色谱纯化分析。分析结果显示,TTF1识体对TTF1的纯化具有较高的特异性。识体亲和色谱的最

大优势是:能够实现天然蛋白质非亲和标记纯化,避免了天然标记物对蛋白质的结构和功能的影响。

3. 毛细管电泳

核酸识体在分离和检测上的优越性,使其在蛋白质的毛细管电泳定量分析中作为亲和探针也表现出了非常诱人的一面[155,156]。电泳法可以根据电泳性能的变化从识体-靶分子复合物中有效地分离游离识体,这是因为电泳性能的变化是由识体与靶分子相互作用时所引起的结构转变或尺寸变化所致。而且,识体易于荧光标记,这样就可以利用激光诱导荧光(laser-induced fluorescence,LIF)实现对毛细管电泳的灵敏检测。

为了弥补或改善亲和电泳方法中抗体的不足,研究者们采用分子识体作为探针进行亲和分析[157,158]。如 Pavske 和 Le[157]发展了以 HIV-1RT 逆转录酶识体为亲和探针的非竞争毛细管电泳-LIF(CE/LIF)亲和分析法。该法使用荧光标记的单链 DNA 识体,对 HIV-1RT 进行定量,检测限达 $50nmol \cdot L^{-1}$,且不受其他病毒[如鸟粒细胞病毒(avian myeloblastosis virus,AMV)、莫洛尼氏白血病毒(moloney murine leukaemia virus ,MMLV)]的 RT 干扰。这种分析方法尽管没有做到可对整个细胞或血浆中 HIV-1RT 进行直接测定,但实现了 HIV-1 病毒细胞培养液中 RT 活性的测定。分子识体作为亲和探针具有如下优点:特异性高、分析时间短、化学处理更简单以及不用使用放射性同位素标记物。

亲和毛细管电泳是利用识体亲和探针研究蛋白质-DNA 相互作用的另一种有趣的方法[157]。这种方法能够对样品中极少量蛋白质进行分析,且对目标蛋白质的分离不需要使用分离缓冲液,避免了电渗流中蛋白质的影响。Deng 等[152]利用一种典型的蛋白质/识体对[人凝血酶(Thr)]考察了利用识体和亲和色谱进行蛋白质定量分析的可能性。结果显示,Thr 的检测限为 $60nmol \cdot L^{-1}$,灵敏度可与平衡法相媲美。6 次实验(改变 Thr 和识体浓度)计算出的分离常数 K_d 为 $(240 \pm 16)nmol \cdot L^{-1}$,高于文献报道值的 $200nmol \cdot L^{-1}$[159]。

毛细管电泳还可直接用于 SELEX 过程的分离实验[160]。Wiegandr 等[161]利用 CE 分离技术仅仅通过两轮筛选就可从结合和游离的 DNA 中筛选出 IgE 识体。利用这种方法还可以在游离溶液中进行筛选以除去固相支持物,从而省去了传统 SELEX 中的冲洗步骤,在进行 2 或 4 轮筛选后就可以得到各种克隆,解离常数 K_d 在 $27 \sim 84nmol \cdot L^{-1}$,稍高于传统 SELEX 方法在筛选 15 轮后所得的值($6nmol \cdot L^{-1}$)。此方法仅仅进行两轮 CE-SELEX,在 DNA 库中就有 100%序列与 IgE 结合。与传统 SELEX 得到的富集率(筛选 6、12 和 18 轮,富集率分别为 50%、93% 和 100%)相比,该法的富集率非常高。一个 CE-SELEX 循环在 1 天内便可完成,所以在 2～4 天就可得到 IgE 识体。

4. 质谱

目前，已有文献报道核酸识体已作为亲和基质激光解析离子化质谱（affinity matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry，MALDI-MS）蛋白质捕获与分析中的基质。如 Dick 等[162]将表面修饰有 DNA 凝血酶识体的熔融硅胶玻璃用于了凝血酶的直接检测。与不能形成特征 G-四分体的杂交寡核苷酸相比，DNA 凝血酶识体修饰表面能够特异性地捕获凝血酶。将不同量的凝血酶（5～50pmol · L^{-1}）与识体点进行温育检测，发现其最佳检测为 10pmol · L^{-1}，且随着识体点的变化，检测能力也发生变化，最低能检测到 5pmol · L^{-1}。通过在低 pH 基体中使识体折叠，可以使捕获循环（释放与分析）在同一识体点重复进行。此外，利用识体修饰表面还可以从人血清等复合基体中选择性地捕获凝血酶。

5. 识体信标（signalling aptamer）

分子信标（molecular beacon，也称分子灯塔）是一种均相检测核酸序列的荧光探针，也被广泛用于实时 PCR 中。分子信标为“发夹状结构”，其“茎”由特定核苷酸组成，其“环”的一端结合荧光，另一端结合荧光猝灭剂，两端邻近时无荧光发生；当茎部核苷酸与互补序列杂交后展开，远离猝灭剂时则发荧光。分子信标原本只能用于核酸的检测，以核酸识体为桥梁可将其应用于非核酸（如蛋白质等）的检测，优点一是消除了以往用荧光加强法时核酸酶污染导致核酸降解而造成的假阳性荧光信号，二是可用来检测自然状态下不与 DNA 结合的蛋白质[163]。这些识体是均相检测发展的有利工具，避免了多步固定和冲洗步骤。

图 7.32 显示了几种核酸识体向“信标识体”的转化。这种转化主要基于实时荧光信号报告靶分子的存在。用荧光团修饰识体和设计实时信标识体的方法之一就是将荧光团连接在识体特定的位置，靶分子结合可以诱导此特定位置发生构象变化。如 Jhaveri[164]根据靶分子结合位点的不同，对两种不同的抗腺苷识体（一种来自 DNA 库，一种来自 RNA 库）在不同位置用不同的染料进行修饰，考察了靶分子与识体相互作用引起的荧光强度变化。在各种修饰识体中，在 13 残基含有氮蒽或在 7 和 8 残基之间有荧光素的识体，在 1mmol · L^{-1} ATP 的存在下荧光强度均表现出较高的增强。而在 GTP、CTP 或 UTP 存在下或者在考察某一识体突变翻译时均没有发现有明显的配体依赖荧光增强。这两种信标识体在 ATP 的定量检测中具有很高的再现性。

分子灯塔（即所谓的“识体灯塔”）在很多方法中都得到了很好的应用[165]。这些方法综合了识体的结合特异性和分子灯塔突出的信号转换能力[图 7.32(a)]。最初的识体灯塔是由 Yamamoto 和 Kumar 报道的 HIV-1 的 Tat 蛋白[166][图 7.32

(b)]。他们把一个双链 RNA 识体分成两个低聚体,一个转化成 DNA 探针,另一个设计成发卡结构,其中一部分与 DNA 探针互补,在发卡的两端分别是荧光团(荧光素)和猝灭剂[4(4′-二甲基氨基苯基偶氮)安息香酸]。没有 Tat 存在时,两个核酸分子独立存在,当引入蛋白质时,灯塔结构发生改变,并与识体另一半相互作用结合 Tat。当发卡结构打开时,就会使荧光团-猝灭剂对发生物理分离,引发荧光增强。

Li 等[165]报道了凝血酶识体灯塔的应用。他们构建了两种类型识体灯塔,一种由荧光团-猝灭剂对标记,另一种由两个荧光团(给体-受体对)标记,这种标记以共振荧光能量转移(resonancefluorescence energy transfer,FRET)为基础。他们利用这两种方法实现了对蛋白质-识体结合的实时观测和对均相蛋白质的定量检测。

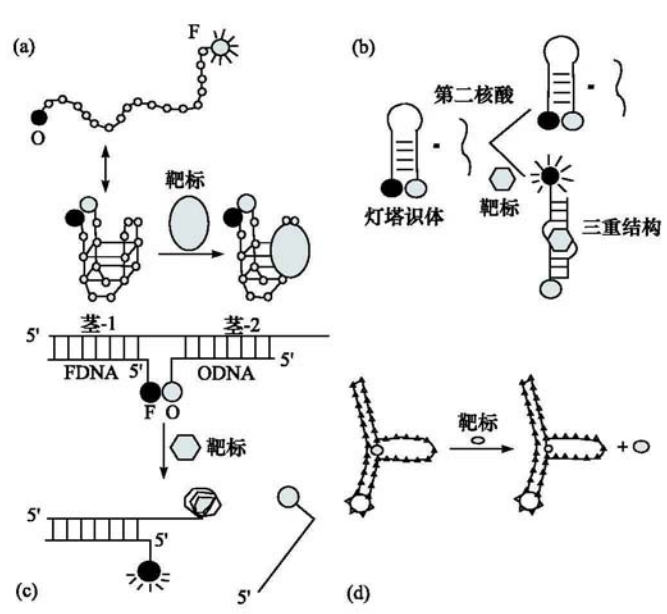


图 7.32　不同信标识体设计示意图

(a)荧光-猝灭团标记的分子识体信标的工作机制:凝血酶的加入使平衡向四分体结构转化,从而使荧光团和猝灭团接近,最终导致荧光猝灭;(b)双链 RNA 识体分裂成两个低聚体:无靶标分子时,两个核酸独立存在;当加入蛋白质时,识体信标通过改变自身的结构与识体的另一部分相互作用进而与靶标分子结合。发夹结构的打开,使荧光团-猝灭剂对发生物理分离,从而导致荧光增强;(c)荧光团标记的 DNA 识体和修饰猝灭剂的互补小寡核苷酸(QDNA):无靶标分子时,识体与 QDNA 杂交,使荧光团与猝灭团接近,从而产生荧光猝灭;有靶标分子时,识体较易与靶标分子形成复合物,从而将 QDNA 从荧光团标记的识体中释放出来,使荧光增强;(d)将一种转异的染料与可长因结合识体温育后,可卡因的加入,使染料的吸光度发生位移,位移的程度与可卡因的浓度成比例关系

Hamaguchi 等[167]报道了另一种分子灯塔设计方案：将一抗-凝血酶识体放置在分子灯塔中作为其中的一段。2004 年，Nutiu 等[168]又报道了两种分子灯塔机制：结构开关与荧光-猝灭[图 7.32(c)]。这两种方法都是利用荧光标记的 DNA 识体和修饰有猝灭剂的互补寡核苷酸(QDNA)小分子实现定量分析。在没有靶分子(ATP 和凝血酶)的存在下，识体和 QDNA 进行杂化，使荧光团和猝灭剂接近，产生荧光猝灭。有靶分子时，识体-QDNA 双链复合物的形成有助于生成识体-靶分子复合物，这样 QDNA 就会从荧光团标记的识体中释放出来，引发荧光强度的增强。

此外，研究者们还致力于非标记识体的方法来取代传统信标识体的开发。事实上，由于靶分子结合位点和构象变化精确度的不确定性，设计理想的标记方案往往很难。而且，RNA 的不稳定性使 RNA 识体的标记变得非常困难。Stojanovic 等[169]用可卡因识体发展了比色探针[图 7.32(d)]，并首次对含 35 个染料的文库进行了筛选，考察它们在可卡因的存在和不存在下与识体的结合情况。在这些染料中，二甲基硫三碳菁碘化物染料被选来构建比色传感器。将染料与识体温育，加入可卡因，染料被取代，吸光度下降，随着可卡因浓度的增加，吸光度值逐渐减小。当加入可卡因代谢物(苯甲酰芽子碱)时，识体-染料复合物的可见光谱不发生变化，从而显示了比色探针对可卡因的高选择性。该方法简便易行，成本低，是一种很好的分析方法。

Jiang 等[170]首次利用非标记 DNA 和 RNA 识体进行了均相蛋白质检测。他们利用一种新型“光开关”复合物二邻菲罗啉联吡啶吩嗪钌(Ⅱ)(phen：1,10-phenanthroline，dpp2：dipyrido[3,2-a：2′,3′-c]phenazine)来感知识体-蛋白质的结合。当$[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$与 dsDNA 结合时，就会产生荧光，在没有 DNA 的溶液中，$[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$不产生荧光。识体的折叠结构使$[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$和随之散射的荧光相互作用，从而使$[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$对双链核酸具有高的亲和力(约 10^6 L · mol^{-1})。靶蛋白与识体的结合诱导识体结构发生构象变化，这种构象变化影响着光的散射，从而形成蛋白质依赖发光变化。同时，他们还用 3 种不同识体(一个 IgEDNA 识体、一个 PDGF-BB DNA 识体和一个凝血酶 RNA 识体)对该法进行了验证。用第一个 DNA 识体对进行定量，根据发光强度的变化绘制了一滴定曲线，在蛋白质浓度低于纳摩尔每升的范围内具有很好的线性关系，检测限为 100pmol · L^{-1}。将识体/$[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$和其他蛋白质如血红蛋白、BSA、溶解酵素及 IgG 进行温育，没有发现发光强度有明显的变化。在生理缓冲液和 1%血清中，用 PDGF-BB 识体对蛋白质的检测限都能达到 1.0nmol · L^{-1}。另外，为了验证该方法能够用于蛋白质的检测，他们又对 RNA 识体进行了新的标记设计，用于检测 α 凝血酶。结果表明，α 凝血酶具有较宽的检测范围(1nmol · L^{-1})，检测限可低至 10pmol · L^{-1}。需要注意的是，由于 RNA 分子容易

被血浆中内生核糖核酸酶降解，所以实验只能在生理缓冲液中进行。

最近，Ho 等[171]又新报道了一种基于抗凝血酶识体和“聚合染色”的生物光分析方法。在此报道中，水溶性的聚噻吩阳离子将识体和靶分子的结合转换成光信号。该法是基于阳离子聚(3-烷氧基-4-甲基噻吩)衍生物和阴离子单链寡核苷酸之间不同的静电作用和分子构象，所以无需对识体进行标记。靶分子凝血酶和识体的结合促进了两个 G-四分体形成一紧密单分子四重结构。阳离子聚合物包裹在四重结构外面，从而与识体和凝血酶形成 1∶1∶1 的橘红色复合物，并用 UV-vis 光谱对此复合物进行表征。该法对凝血酶表现出高的特异性选择，检测限为 1×10^{-7} mol · L^{-1}。

6. 邻近连接(proximity ligation)

Fredriksson 等[172]将识体和所谓“邻近依靠的 DNA 连接测定”相结合发展了一种高灵敏检测血小板衍生生长因子 B-链同型二聚体(PDGF-BB)的方法。在此法中，用附加序列对 PDGF-BB DNA 识体进行修饰，以形成“邻近探针对”。当识体与 PDGF-BB 相结合时，延长的自由端就会和随后加入的连接器寡核苷酸进行杂化，从而通过酶 DNA 连接实现端基连接[173]。连接产物通过聚合酶链反应放大，而未反应的探针仍保持原状。他们从连接器寡核苷酸浓度(400nmol · L^{-1})、预温育体积(5μl)和邻近探针(20pmol · L^{-1})3 个因素对均相和固相分析进行优化。在均相分析中能检测到 24 000 个 PDGF-BB，比 ELISA 对同一蛋白的检测少了约 1000 倍，浓度范围的扩大超过 1000 倍，邻近连接分析得到的变化系数(CV)为 35%，高于 ELISA 得到的 CV(32%)。在固相邻近连接分析中，用同一对均相分析邻近探针可以检测到浓度低于 10～8mol · L^{-1}的蛋白质，与传统的 ELISA 方法相比，也显示了较高的检测灵敏度。

7.10.2　靶点确认与药物开发

人类基因组研究特别是疾病相关基因的研究为制药业提供了数以千计的潜在的新药靶点。一个有效靶点的获得需要各个层面的生物学功能确认。核酸识体通过相应载体导入细胞或动物模型可模拟小分子药物的作用方式，从而使结果直观化。核酸随机库本身也是药物先导分子筛选的优良文库。如果能够改造核酸识体使其具有核酶抗性和血浆稳定性等，还可以直接作为治疗性药物加以应用。

其他药靶确认方法存在不同程度的缺陷。基因剔除成本高，且会产生一些预期之外的性质，有时甚至是致死性的[174]。反义核酸的毒性、不稳定性和免疫原性等问题制约了它的应用[175]。RNA 干扰往往引发 RNA 依赖性蛋白质激酶通路的异常活化，导致非特异性的核酸降解[176,177]。核酶也只能提供有限的发病过程的蛋白质功能相关信息[178]。相比之下，核酸识体在蛋白质水平抑制靶分子功能的

作用方式更加安全、有效,而且核酸识体抑制蛋白质的作用是可逆的。迄今为止,靶点蛋白确认技术主要依靠来自抗菌素阵列文库的抗体或多肽。但是,较长的发展时间(如来自免疫动物的 mAb 需要 6 个月)、需要活体产生(动物/细胞)及一定程度上弱的特异性(如多肽)使它们的一般应用变得非常复杂。此外,利用抗体作为靶点确认工具不能用于胞外靶分子,这是因为非胞内环境限制了细胞内抗体的应用。胞内靶分子因此更容易接近小分子质量的识体,识体通过荧光团或纳米粒子(如量子点)修饰后可以进行定位研究[179]。

识体可成为识别技术中抗体、多肽或基因的理想取代品。目前,无论是细胞内还是细胞外都已筛选出了很多识体,包括高特异性的 PDGF 识体[180]、黏胶素-C(tenascin-C)识体[181]、人内生长因子受体-3 识体[182]及 IFN-γ-可诱导 CXCL10 趋化因子识体[183]。后来,Marro 等[183]又报道了一系列对人或鼠 CXCL10 具有高亲和力的抗核酸酶 RNA 识体。CXCL10 是一趋化因子,出现在各类炎症疾病中。由于这些识体中的一些能够较好选择性地识别 CXCL10,所以可以有力地解释 CXCL10/CXCR3 受体和其他趋向因子/受体体系的复合串音杂讯(complex cross talk)。

Lupold 等[184]研究发现识体通过竞争和非竞争机制可以抑制靶分子,这就意味着人们可以在不改变模型体系中蛋白质位置的情况下,研究在高度有序蛋白质复合物中靶蛋白的不同抑制机制及其遗传翻译后的构象[185]。Seiwert 等[186]对能区分 Erk-2MAP 激酶的磷酸化和非磷酸化构象的识体做了详细报道。

核酸识体在生物体内很快被核酸酶降解,或因分子质量小而被机体迅速清除,故需对其进行各种修饰,以适应作为治疗性用药的要求。修饰的方式有两种:一种是在筛选前,即用修饰性文库代替天然文库进行筛选,常用的修饰位置是磷酸基团、嘧啶环的 5′位、嘌呤环的 8′位以及五碳糖的 2′位。生物体液中的核酸酶为嘧啶特异性,用 2′-氨基或 2′-氟基取代嘧啶核苷中 2′位的羟基后,则可免于被降解。另一种是在筛选出识体后再进行修饰,例如在其 5′端偶联上 20～40kDa 的聚乙烯二醇或二酰基甘油酯基团,可以延长体内的半衰期。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)是一种血管分裂原,能促进内皮细胞有丝分裂,与肿瘤新生血管的形成及其他血管增生性疾病关系密切。聚乙二醇偶联的 VEGF165 RNA 型识体 NX1838 是第一个进入临床试验的识体药物,用于治疗渗出性老年黄癍病变,该药物的应用已进入临床三期第二阶段实验。核仁素(Nucleolin)是一种能与 RNA 或单链 DNA 结合的核蛋白,存在于正常细胞的胞核区,但在癌细胞中却移位至胞膜表面。Aptamera 公司研制的 AGRO100 是一种新型的核酸识体药物,临床前试验表明,AGRO100 可在癌细胞表面与 Nucleolin 结合,抑制癌细胞 DNA 的复制并诱导细胞凋亡。AGRO100 对多种癌症均有抑制作用[187],如肺癌、前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、恶性黑色素瘤及白血病等,AGRO100

已于 2003 年第三季度进入Ⅰ期临床试验。结果显示,人体对 AGRO100 的耐受几乎是无上限的,2004 年 8 月 FDA 已认证 AGRO100 为胰腺癌罕见病用药(corphandrug designation)。

抑制 HIV-1 逆转录酶是治疗 AIDS 的关键点之一。Joshi 等在 HIV(R3B)感染的 293T 细胞中稳定表达了一种能抑制 HIV-1 逆转录酶活性的 RNA 识体,成功阻断了 HIV-1 的逆转录过程[188]。在体液免疫和细胞免疫的选择压力下,HIV-1的突变株增多,对许多药物产生抗性,例如 R5 株即能逃避抗体 17b(针对 *gp*120~CD14 复合物)的攻击。Khati 等针对此变异株病毒 *gp*120 部分保守区域(结合细胞因子)筛选得到的 2′F-RNA 型识体不但能以高亲和力结合 *gp*120,且可将抑制 HIV-1 感染人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)的活性提高 1000 倍[189]。与抗体相比,这种识体的抑制活性不依赖于 CD14 与 *gp*120 的结合,有望成为治疗艾滋病的一代新药。

7.10.3 医学诊断、治疗与药物筛选

SELEX 技术筛选出的核酸识体能特异地与在疾病发生发展中起重要作用的靶分子结合,阻断或封闭靶分子的功能,而且它缺乏免疫原性,体内渗透力强,因此是一种很有发展前途的药物分子,可用于直接干扰疾病的发生发展过程,从而达到预防和治疗疾病的目的。目前,人们已开发出了一些肿瘤、爱滋病、肝炎等相关的蛋白质的核酸识体,一些已进入临床试验,可望发展成新型药物[190]。

但需注意的是,经体外筛选获得的核酸识体所表现出的一些优良性质,在体内实验中可能会完全失效,所以分子识体仅能用作非肠胃注射药物,如将药物直接注射到作用位点(细胞内注射)。但是,目前已有文献证明了识体药物可以在动物体全身使用[191,192],并且其在人体内的应用研究也正在进行。近来一种反义识体已投入了Ⅰ期临床,用于 17 位传统治疗方法无法医治的癌症患者[193]。但是,由于识体本身稳定性的局限,使其在活性药物的浓度必须保持恒定的慢性疾病中仍然不能进行长期系统的应用。另外,在抗体治疗过程中,识体治疗难以传输到细胞内,因此不能与细胞内靶分子发生相互作用[194]。

另有两种识体也已进入了临床诊断:一种是用于抑制 HIV 复制[195],另一种是抗凝血酶识体,作为抗凝血剂/抗血栓剂有望应用在冠状动脉旁路外科中[196]。识体序列既能测定分子结构又能测定其本身固有的复制编码和可能与其他核苷配对的碱基。后者可与具有抵抗识体药效作用的“Watson Crick”碱基配对形成“解毒剂”[197]。尽管识体药物不可能用于所有的疾病诊断,但这一特性增加了它们在生理体系中的应用价值。如 Rusconi 等[198]用一种匹配的解毒剂成功实现了凝结因子 IXa 的识体活性的调整。

至今,识体治疗药物已在抗感染、抗凝结、抗炎、抗血管新生、抗增殖及免疫治

疗中得到有效使用[191,192]。生物药品与其他小分子药物的制造相比,成本较高。识体药物很有可能在抗体范围内使生产成本更高。但合成的成本主要取决于生产规模、识体长度、序列组成及识体的修饰度,其他因素如与其他小分子药物相比有限的放置时间可能会进一步影响其成本。但是,对新生物药品的日益需求将会加速低本高效生产过程的发展。识体在靶点确认、药物开发及疾病诊断等领域的应用正趋向微量化,这就使成本问题显得不太重要了。

核酸识体在药物筛选方面也得到了很好应用。如在癌症的治疗中,Kensch等[199]筛选出的 RNA 核酸识体在浓度为 $1nmol \cdot L^{-1}$ 时就能成功地抑制碱性成纤维细胞因子(bFGF)与细胞膜上受体的结合。Raf-1 癌基因编码的胞质蛋白 Raf-1 具丝/苏氨酸激酶活性,在调控细胞生长、增殖发育分化的信号转导过程中起重要作用。Raf-1 的 RNA 核酸识体能特异性结合 Raf-1 的 Ras 蛋白结合域,使之不能被 Ras 激活进行信号传导[200]。在病毒感染的治疗中,Joshi 等[188]筛选出了能与 HIV-1 逆转录酶高亲和力结合,从而抑制 HIV 病毒感染的 RNA 识体。Fukuda 等[201]提纯了针对 HCV 的 NS3(非结构蛋白 3)蛋白水解酶具特异性的 RNA 识体。最近,Jeon 等[202]筛选出了能封闭流感病毒受体结合域而抑制流感病毒感染的 DNA 识体。在治疗心血管疾病方面,Ruscone 等[198]筛选得到特异识别并能够有效抑制凝血因子的活性识体。Liu 等[203]筛选出了能与牛凝血酶结合的 RNA 识体。目前,SELEX 技术在肿瘤、炎症等其他疾病治疗与药物筛选中也取得了显著成效。

7.10.4 分子开关

核酸识体在不同条件下可以反复变性/复性并可在与配体结合后通过构型适配引起构型改变,预示其能够成为良好的分子开关(molecular switching)。识体核酶(aptazyme)就是核酸识体在分子开关应用领域的一个新的发展方向。它将核酸识体的配体结合能力与核酶(ribozyme)的催化活性相结合[118,204]。最常用的核酶为能在特定位点催化剪切 RNA 的锤头状酶,其催化剪切活性可通过变构调节。人们将核酸识体作为效应分子的结合序列,与核酶的催化活性部位(通常为锤头状核酶具催化活性的保守序列)通过一个通讯元件序列相连。核酸识体的配体都可用来作为效应分子,与核酸识体结合后,识体核酶发生构象变化,从而影响到催化部位活性的改变,催化反应的速率常数极大改变(增加或减小)。图 7.33 为其原理示意图。

核酸识体识别位点能特异性捕获各种配体,催化部位极大地放大信号是识体核酶的一大优势,因此它既可用于检测分析型生物传感器的探头,而且也能发展为一个良好的分子开关。然而并非将核酸识体序列与核酶的序列简单地连接在一起就可获得具有变构调节功能的识体核酶。目前,识体核酶的设计一般以

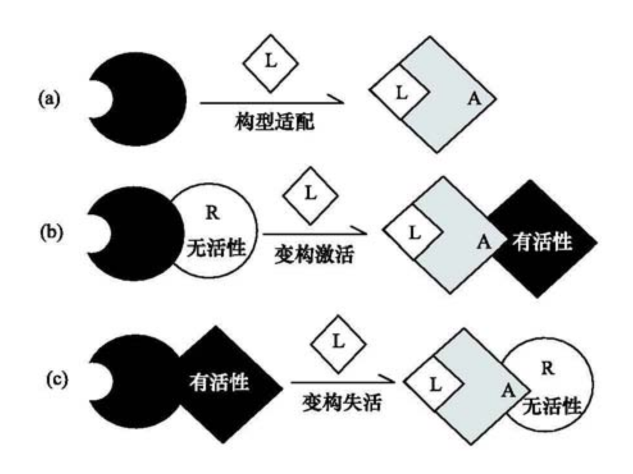


图 7.33　变构调节核酶原理示意图[138]

A:核酸识体,效应分子结合部位;L:与核酸识体特异结合的配体 R:催化活性中心

核酸识体和核酶序列为基础,先通过合理预测(主要是通讯元件部分的序列设计),然后经体外筛选方式完成。目前已经得到以 ATP、黄素单核苷酸 FMN、茶碱以及蛋白质等为效应分子的识体核酶。Soukup 小组最近报道了一个 9-nt 通讯元件的通用序列,但应用范围仍然有限。随着人们对核酸分子多态性研究的深入,识体核酶受变构控制的机制将被清楚阐明,人们将能理性地设计出符合需要的识体核酶。

综上所述,SELEX 技术自问世以来发展迅速,导向 SELEX(blended SELEX)、复合靶 SELEX(complex targets SELEX)、反向 SELEX、基因组 SELEX(genomic SELEX)、剪切 SELEX 等相继建立,大大扩展了其灵活性,在分析、靶点确认、药物开发及疾病诊断、分子开关等许多领域展现出了良好的应用前景。筛选过程的自动化将不断提高生产效率,增加产量[205],快速产生核酸识体,把导向物质的结合与特定病理生理参数相联,为新的疾病治疗方法的发展提供新的途径。相应专利的逐渐放开会进一步降低药物研制成本,为核酸识体的商品化铺平道路。在未来的发展中,分子识体还有可能在早期靶点确认、疾病诊断、药物研制和治疗与干预之间建立智能桥梁(图 7.34)[206]。

今后基础研究的工作重心将在于探讨核酸识体与其配体的结合对于生命过程可能产生的各种调节作用;应用研究则将着重于核酸识体型新药的研制,这也是最具挑战性和吸引力的领域;而核酸识体作为新型识别元件也将被推广到分析化学的其他领域,发展出更多更好的亲和检测系统。

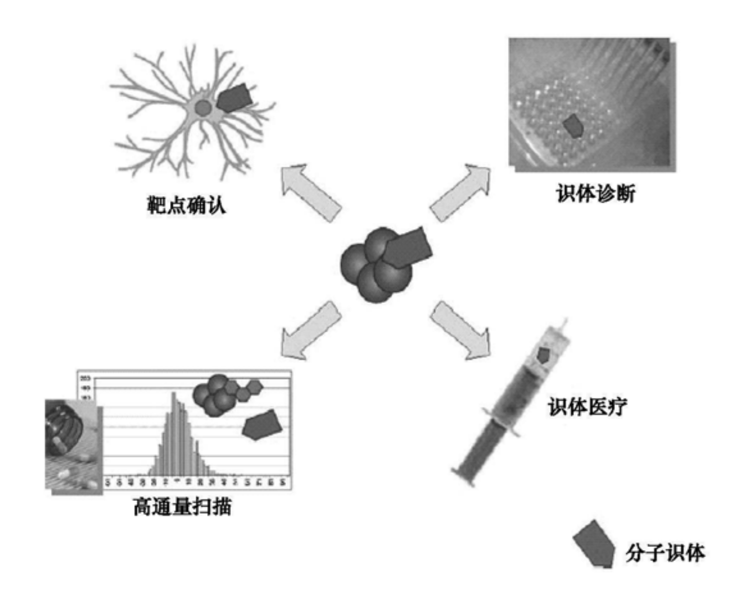


图 7.34　核酸识体可能作为医疗和疾病诊断、靶点确认及小分子药物研制的多功能工具

参 考 文 献

[1] Price C P, Newman D J. Principles and practice of immunoassay. 2nd edition. USA: Grove Dictionaries Inc., 1996

[2] Holme D J, Peck H. Anal. Biochem. 3rd edition. Addison Wesley Longman, 1998

[3] 于善谦,王洪海,朱乃硕等.免疫学导论.北京:高等教育出版社,1999

[4] 王重庆.分子免疫学基础.北京:北京大学出版社,1997

[5] 汪尔康. 21 世纪的分析化学.北京:科学出版社,1999

[6] 中华人民共和国卫生部医政司.全国临床检验操作规程(第二版).南京:东南大学出版社,1997

[7] 林学颜,张玲.现代细胞与分子免疫学.北京:科学出版社,1999

[8] 金伯全.细胞和分子免疫学(第二版).北京:科学出版社,2001

[9] 吴敏毓,刘恭植.医学免疫学.合肥:中国科学技术出版社,2002

[10] 罗明泉,吴旭琨,安云庆,罗菲.实用临床免疫学诊断.北京:海洋出版社,2000

[11] 沈霞,李稻.临床免疫学与免疫学检验新技术.北京:人民军医出版社,2002

[12] 李振甲,陈泮藻,高平,颜光涛.时间分辨荧光分析技术与应用.北京:科学出版社,1996

[13] Kakabakos M et al. *clin, chem*. 1992, **38**: 338

[14] Pagni R et al. *Eur. J. Lab. Med*. 1995, **3**(**2**): 167

[15] Lim S et al. *Bull. Koream Chem. Soc*. 1997 , **18**: 761

[16] Yoshio I, Kyuji R. *Anal. Chim. Acta*. 1993, **284**:227

[17] Monji N, Hoffman A S. *App. Biochem. Biotech*. 1987, **14**:107

[18] Liu F H et al. *Chin. Chem. Leff*. 1994, **4**: 325

[19] 常文保, 张柏林, 慈云祥. 分析化学, 1994, **22**:1167

[20] Ju H X, Yan G F, Chen F et al. *Electroanal*. 1999, **11**:124

[21] Pauling L J. *J.Am. Chem. Soc*.1940,**62**:2643
[22] Wulff G,Sarhan A. *Angew. Chem. Int. Ed*.1972,**11**:341
[23] Vlatakis G,Andersson L I,Muller R et al. *Nature*.1993,**361**:645
[24] Bruggemann O,Haupt K,Ye L. *J. Chromatogr. A*. 2000,**889**:15
[25] 姜忠义,吴洪.分子印迹技术.北京:化学工业出版社,2003
[26] Katz A,Davis M E. *Nature*.2000,**403**:286
[27] Wulff G.*Polymeric reagents and catalysts. ACS-Symposium Series*.1986,**308**:186
[28] Sellergren B. *J. Chromatogr. A*.2001,**906**:227
[29] Wulff G,Dhal P K. *Macromolecules*.1990,**23**:4525
[30] Piletsky S A,Andersson H S,Nicholls I A. *Macromolecules*.1999,**32**:633
[31] Whitcombe M J,Rodriguez M E,Villar P et al. *J. Am. Chem. Soc*.1995,**117**:7105
[32] Klein J U,Whitcombe M J,Mulholland F et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. 1999,**38**: 2057
[33] Toshifumi T,Takashi M,Jun M. *Anal. Chem*.2001,**73**:3869
[34] Yilmaz E,Haupt K,Mosbach K. *Angew. Chem. Int. Ed*.2000,**39**:2115
[35] Yang H H,Zhang S Q,Tan F et al. *J. Am. Chem. Soc*.2005,**127**: 1378
[36] Li Y,Yang H H,You Q H,Zhuang Z X,Wang X R. *Anal. Chem*.2006,**78**:317
[37] 刘俊秋,罗贵民,沈家骢.功能高分子学报. 1998,**11**:561
[38] Andersson H S,Karlsson J G,Piletsky S A. *J. Chromatogr. A*. 1999,**848**:39
[39] Hagmaka J,Takekra H,Hosoya K. *J. Chromatogr. A*.1999,**849**: 331
[40] 成国祥,张立永,付聪. 色谱. 2002,**20**: 103
[41] 王永健,白姝,孙彦. 离子交换与吸附. 2001,**17**: 360
[42] Uezu K,Nakamura H,Goto M. *J. Chem. Eng. Jap*.1994,**27**:436
[43] Murata M,Hijiya S,Maeda M,Takagi M. *Bull. Chem. Soc. Jap*.1996,**69**:637
[44] Koide Y,Senba H,Shosenji H. *Bull. Chem. Soc. Jap*.1996,**69**:125
[45] Glad M,Norrlow O,Sellergren B. *J. Chromatogr*.1985,**347**:11
[46] Kempe M,Glad M,Mosbach K. *J. Mol. Recogn*.1995,**8**:35
[47] Senel S,Kassab A,Arica Y. *Colloids Surf. B*. 2002,**24**:265
[48] Burow M,Minoura N. *Biochem. Biophys. Res. Commun*.1996,**227**:419
[49] Shi H,Tsai W B,Garrison M D. *Nature*.1999,**398**:593
[50] Guo T Y,Xia Y Q,Hao G J. *Biomater*. 2004,**25**:5905
[51] 郭天瑛,夏永清,郝广杰等.化工进展. 2003,**22**:713
[52] Rachkov,Minoura N. *Biochim. Biophys. Acta*.2001,**1544**:25
[53] Rachkov,Minoura N. *J. Chromatogr. A*.2000,**889**:111
[54] Tai D F,Lin C Y,Wu T Z et al. *Anal. Chem*.2005,**77**: 5140
[55] 赖家平,曹现峰,何锡文.化学学报.2002,**60**:322
[56] Haginaka J,Sanbe H J.*Chromatogr. A*.2001,**913**:141
[57] 郑细鸣,涂伟萍.材料导报.2004,**18**:57
[58] Kempe M,Mosbach K. *J. Chromatogr. A*. 1995,**691**:317
[59] Zhu Q Z,Haupt K,Knopp D. *Anal. Chim. Acta*.2002,**468**:217
[60] Sellergren B. *J. Am. Chem. Soc*.1988,**110**:5853
[61] Yu C,Mosbach K. *J. Org. Chem*.1997,**62**:4057

[62] 董襄朝，孙慧，吕宪禹．化学学报．2002，**60**：2035

[63] Huang X D，Zou H F，Chen X M．*J. Chromatogr. A*．2003，**984**：273

[64] Andersson L I．*Anal. Chem*．1996，**68**：111

[65] Haupt K，Dzgoev A，Mosbach K．*Anal. Chem*．1998，**70**：628

[66] Berglund J．Lindbladh C．*Anal. Commun*．1998，**35**：3

[67] 王虹，孙彦．高分子通报．2005，**1**：86

[68] Nicholls I A，Bamstrm O，Mosbach K．*J. Chromatogr. A*．1995，**691**：349

[69] Shea K J，Spivak D A，Sellergren B．*J. Am. Chem. Soc*．1993，**115**：3368

[70] 张先恩．生物传感器．北京：化学化工出版社，2006

[71] Chen Y，Kele M，Sajonz P et al．*Anal. Chem*．1999，**71**：928

[72] Sellergren B．*Anal. Chem*．1994，**66**：1578

[73] Spivak DA，Shea K J．*Anal. Chim. Acta*．2001，**435**：65

[74] Kempe M．*Anal. Chem*．1996，**68**：1948

[75] Zucconi A．*J. Mol. Biol*．2001，**307**：1329

[76] Peter A G，Mosbach K．*React. Funt. Polym*．1999，**41**：115

[77] Haupt K，Mosbach K．*Trends Biotechnol*．1998，**16**：468

[78] Mohr P，Pommetrning K．*Affinity chromatography-pratical and theoretical aspects*．New York：Marcel Dekker．Inc．1985

[79] Andersson L I．*J. Chromatogr. B：biomed. Sci. Appl*．2000，**745**：3

[80] Piletsky S A，Piletskaya E V，Elgersma A V．*Biosens. Bioelectron*．1995，**10**：959

[81] Ramström O，Ye L，Mosbach K．*Chem. Biol*．1996，**3**：471

[82] Baggiani C，Giraudi G，Trotta F．*Talanta*．2000，**51**：71

[83] 朱庆枝，李顺华．福州大学学报．1999，**27**：116

[84] Surugiu I，Danielsson B，Ye L et al．*Anal. Chem*．2001，**73**：487

[85] Surugiu I，Svitel J，Ye L et al．*Anal. Chem*．2001，**73**：4388

[86] Venton D L，Gudipati E．*Biochim. Biophys. Acta*．1995，**1250**：126

[87] Hart B R，Shea K J．*J. Am. Chem. Soc*．2001，**123**：2072

[88] 袁勤生，赵健．酶与酶工程．广州：华东理工大学出版社，2005．404

[89] Leonhardt A，Mosbach K．*React. Polym*．1987，**6**：285

[90] Beach J V．*J. Am. Chem. Soc*．1994，**116**：379

[91] Matsui J．*J. Org. Chem*．1996，**61**：5414

[92] Wullf G．*Angew. Chem. Int. Ed*．1997，**36**：1962

[93] 余建华，黄启斌，马德君等．自然科学进展．2001，**11**：101

[94] Cheng Z Y，Zhang L W，Li Y Z．*Chem. Eur. J*．2004，**10**：3555

[95] Haupt K，Mosbach K．*Chem. Rev*．2000，**100**：2495

[96] Scheller F W，Wollenberger U，Warsinke A et al．*Curr. Opin. Biotechnol*．2001，**12**：35

[97] Tabushi I，Kurihara K，Naka K．*Tetrahedron Lett*．1987，**28**：4299

[98] Kriz D，Mosbach K．*Anal. Chem. Acta*．1995，**300**：71

[99] Panasyuk T L，Mirsky V M，Piletdky S A．*Anal Chem*．1999，**71**：4609

[100] Shoji R，Takeuchi T，Kubo I．*Anal. Chem*．2003，**75**：4882

[101] Ramanaviciene A，Ramanavicius A．*Biosens. Bioelecton*．2004，**20**：1076

[102] Kitade T, Kitamura K, Konishi T. *Anal. Chem.*2004,**76**:6802
[103] Kobayashi T,Murawaki Y,Reddy P S. *Anal. Chim. Acta.*2001,**435**:141
[104] Tan Y G,Nie L H,Yao S Z. *Analyst.*2001,**126**:664
[105] Cao L,Zhou X C,Li F Y. *Analyst.*2001, **126**: 184
[106] Dickert F L,Hayden O. *Anal. Chem.*2002,**74**: 1302
[107] Kriz D,Ramstrtin O,Svemsson A. *Anal. Chem.*1995,**67**:2142
[108] Levi R,MeMiyen S,Pitetsky S A. *Anal. Chem.*1997,69: 2017
[109] Jenkins A L,Uy O M,Murray G M. *Anal. Chem.* 1999,**71**:373
[110] Jenkins A L,Uy O M,Murray G M. *Anal. Commun.* 1997,**34**:211
[111] Rachkov A,McNiven S,Elgkaya A. *Anal. Chim. Acta.*2001,**405**:23
[112] Chianella I,Piletsky S A,Tothill I E. *Biosens. Bioelecton.* 2003,**18**: 119
[113] Lin J M,Yamada M. *Analyst.* 2001,**126**: 810
[114] Ye L,Mosbach K. *J. Am. Chem. Soc.*2001,**123**:2901
[115] Tuerk C,Gold L. *Science.* 1990,**249**: 505
[116] Clark S L,Remcho V T. *Electrophoresis.* 2002,**23**:1335
[117] JayH,Michael P R,Sday J. *Mol. Biotechnol.* 2000,**74**: 15
[118] Soukup G A,Breaker R R. *Nanotechnol.* 1999,**17**: 4
[119] 付玉英. 国外医学病毒学分册.2005,**12**:70
[120] 汪俊,江雅新,方晓红等.物理.2003, **32**: 732
[121] Jayasena S D. *Clin. Chem.* 1999,**45**: 1628
[122] Bruno J G,Kiel J L. *Biosens. Bioelectron.* 1999,**14**: 4572
[123] 刘晓静,刘韧,顾长国等. 生理科学进展.2004,**35**:374
[124] Hermann T,Patel D J. *Science.* 2000,**287**: 820
[125] Jiang Y,Zhu C,Ling L. *Anal. Chem.* 2003,**75**: 2112
[126] Jenison R D,Gm S C,Pardi A. *Science.* l994,**263**:1425
[127] Rhie A,Kirby L,Sager N. *J. Biol. Chem.* 2003,**278**: 39697
[128] Michaud M,Jourdan E,Villet A. *J. Am. Chem. Soc.* 2003,**125**:8672
[129] Michaud M,Jourdan E. *Anal. Chem.* 2004,**76**: 1015
[130] Zimmermann G R,Jenison R D,Wick C L. *Nature Struct. Biol.* 1997,**6**:644
[131] Mendonsa S D,Bowser M T. *Anal. Chem.* 2004,**76**: 53872
[132] Ikebokuro K,Kiyohara C,Sode K. *Biosens. Bioelectron.*2005,**20**:2168
[133] Hianik T,Ostatna V,Zajacova Z. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.*2005,**15**:291
[134] Lee M,Walt D R. *Anal. Biochem.*2000,**282**:142
[135] Mori T,Oguro A,Ohtsu T. *Nucl. Acid Res.*2004,**32**:6120
[136] Hwang J,Fauzi H,Fukuda K. *Biochem. Biophy. Res. Comm.*2000,**279**:557
[137] Potyrailo R A,Conrad R C,Eillington A D. *Anal. Chem.*1998,**70**:3419
[138] Mccauley T G,Hamaguchi N,Stanton M. *Anal. Biochem.* 2003,**319**:244
[139] Liss M,Petersen B,Wolf H. *Anal. Chem.*2002,**74**:4488
[140] Minunni M,Tombelli S,Gullote A. *Biosens. Bioelectron.*2004,**20**:1149
[141] Schlensog M D,Gronewold T M A,Tewes M. *Sens. Actuators B.*2004,**102**:308
[142] Gronewold T M A,Glass S,Quandt E. *Biosens. Bioelectron.*2005,**20**:2044

[143] Tombelli S, Minunni M, Mascini M. *Biosens. Bioelectron.* 2005, **20**: 2424
[144] Savran C A, Knudsen S M, Ellington A D et al. *Anal. Chem.* 2004, **76**: 3194
[145] Xu D, Yu X. *Anal. Chem.* 2005, **77**: 5107
[146] Clark S L, Remcho V T. *Anal. Chem.* 2003, **75**: 5692
[147] Geiger A, Burgstaller P, Vonder Eltz H. *Nucl. Acids Res.* 1996, **24**: 1029
[148] Williams K P, Liu X H, Schumacher T N M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, **94**: 11285
[149] Romig T S, Bell C, Drolet D W. *J. Chromatogr. B.* 1999, **731**: 275
[150] Lasky L A. *Rev. Biochem.* 1995, **64**: 113
[151] Hicke B J, Watson S R, Koenig A. *J. Clin. Invest.* 1996, **98**: 2688
[152] Deng Q, Watson C J, Kennedy R T. *J. Chromatogr. A.* 2003, **1005**: 123
[153] Murphy M B, Fuller S T, Richardson P M. *Nucl. Acids Res.* 2003, **31**: 18e110
[154] Ristoratore F, Spagnuolo A, Aniello F. *Development.* 1999, **126**: 5149
[155] German I, Buchanan D D, Kennedy R T. *Anal. Chem.* 1998, **70**: 4540
[156] Kotia R B, Li L, McGown L B. *Anal. Chem.* 2000, **72**: 827
[157] Pavski V, Le X C. *Anal. Chem.* 2001, **73**: 6070
[158] Berezovski M, Nutiu R, Li Y. *Anal. Chem.* 2003, **75**: 1382
[159] Bock L C, Griffin L C, Latham J A. *Nature.* 1992, **355**: 564
[160] Mendonsa S D, Bowser M T. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**: 20
[161] Wiegand T W, Williams P B, DreskinS C. *J. Immunol.* 1996, **157**: 221
[162] Dick L W, McGown L B. *Anal. Chem.* 2004, **76**: 3037
[163] Rajendran M, Ellington A D. Nucleic acids for reagentless biosensors. In: Optical biosensors: present and future. Ligler and Taitt Edition, 2002. 369
[164] Jhaveri S D, Kirby R, Conrad R. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**: 2469
[165] Li J J, Fang X, Tan W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, **292**: 31
[166] Yamamoto R, Kumar P K R. *Genes to Cells.* 2000, **5**: 389
[167] Hamaguchi N, Ellington A, Stanton M. *Anal. Biochem.* 2001, **294**: 126
[168] Nutiu R, Li Y. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **125**: 4771
[169] Stojanovic M N, Landry D W. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**: 9678
[170] Jiang Y, Fang X, Bai C. *Anal. Chem.* 2004, **76**: 5230
[171] Ho H A, Leclerc M. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**: 1384
[172] Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J. *Nat. Biotechnol.* 2002, **20**: 473
[173] Green L S, Jellinek D, Jenison R. *Biochemistry.* 1996, **45**: 14413
[174] Harris S, Foord S M. *Pharmacogenomics.* 2000, **1**: 433
[175] Thompson J D. *Drug Discov. Today.* 2002, **7**: 912
[176] Tuschl T, Zamore P D, Lehmann R. *Genes. Dev.* 1999, **13**: 3191
[177] Tuschl T. *Nat. Biotechnol.* 2002, **20**: 446
[178] Rossi J J. *Chem. Bio.* 1999, **16**: R33
[179] Han M. *Nat. Biotechnol.* 2001, **19**: 631
[180] Floege J, Ostendorf T, JanssenU et al. *Am. J. Pathol.* 1999, **154**: 169
[181] Hicke B J, Marion C, Chang F et al. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**: 48644
[182] Chen C H, Chernis G A, Hoang V Q. *Proc Natl. Acad. Sci.* 2003, **100**: 9226

[183] Marro M L, Daniels D A, McNamee A. *Biochemistry*. 2005, **44**: 8449
[184] Lupold S E, Hicke B J, Lin Y et al. *Cancer Res*. 2002, **62**: 4029
[185] Gavin A C, Bosche M, Krause R. *Nature*. 2002, **415**: 141
[186] Seiwert S D, Stines N T, Aigner S. *Chem. Biol*. 2000, **7**: 833
[187] Dickinson L A, Kohwi-Shigematsu T. *Mol Cell Biol*. 1995, **15**: 456
[188] Joshi P, Prasad V R. *J. Virol*. 2002, **76**: 6545
[189] Khati M, Schuman M, Ibrahim J. *J. Virol*. 2003, **77**: 12692
[190] Laura C, Vittorio de Franciscis. *FEBS Lett*. 2002, **528**: 12
[191] Nimjee S M, Rusconi C P, Harrington R A. *Trends Cardiovasc. Med*. 2005, **15**: 41
[192] Nimjee S M, Rusconi C P, Harrington R A. *Annu. Rev. Med*. 2005, **56**: 555
[193] Antisoma. 2005. Promising phase I data for Antisoma's AS1411 revealed at ASCO
[194] Opalinska J B, Gewirtz A M. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2002, 1: 503
[195] Kohn D B, Bauer G, Rice C R. *Blood*. 1999, **94**: 368
[196] http://www.archemix.com/press/pr_jun04.html, 2004, Archemix Announce Submission on An IND for Thrombin Inhibitor ARC183
[197] Rusconi C P, Yeh A, Lyerly H K. *Thromb. Haemost*. 2000, **84**: 841
[198] Rusconi C P, Scardino E, Layzer J. *Nature*. 2002, **419**: 90
[199] Kensch O, ConnollyB A. *Biol. Chem*. 2000, **275**: 18271
[200] KimdIo M, ShirouzuM. *Eur. J. Biochem*. 2002, **269**: 697
[201] Fukuda K, Vishnuvardhan D, Sekiya S. *Eur. J. Biochem*. 2000, **267**: 36852
[202] Jeon S H, Kayhan B, Ben-Yedidia T et al. *J. Biol. Chem*. 2004, **279**
[203] Liu X, Cao G, Ding H. *FEBS Lett*. 2004, **562**: 1252
[204] Breaker R R. *Curr. Opin. Bistechnol*. 2002, **13**: 31
[205] Michael B, Michael B. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 2005, **9**: 336
[206] Proske D, Blank M, Buhmann R. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2005, **69**: 367

第 8 章　生物传感与 DNA 阵列

生物传感器(biosensor)是生物分析化学的一个重要领域,它结合了生命科学、分析化学、物理学和信息科学及其相关技术,能够对所需要检测的物质进行快速分析和追踪。生物传感器的概念最初来源于 Clark[1,2] 关于酶电极的描述,将利用具有生物活性材料构成的分子识别元件称为生物传感器。1962 年 Clark 在氧电极的基础上设计了一种新型葡萄糖传感器,它利用酶的生物活性与待测物起反应,把反应中发生的物理量和化学量的变化转变为电信号或光电信号进行测定,具有选择性高、响应灵敏快速等特点,开创了生物传感器研究的新局面。经过 40 年的发展以及生物技术、生物电子学和微电子学等的不断渗透、融合,生物传感器已不再局限于生物反应的电化学过程,而是根据生物学反应中产生的各种信息(如光效应、热效应、场效应和质量变化等)来设计各种精密的探测装置。如 1974 年,Mosbach 等[3]、Cooney 等[4]发明的热生物传感器,Lubbers 和 Optiz[5] 发明的酶光纤传感器,Giulbault 等[6]报道的压电晶体生物传感器,Liedberg 等[7]开创的利用表面等离子体共振(surface plasmon resonance)方法研究生物分子之间的亲和作用的传感器,以及 Cass 等[8]建立的利用电子传递媒介体的酶电极方法等。生物传感器已被广泛应用于农业、医疗、食品、环保等方面的测定和生命科学研究,它可进行生物体内非破坏性的活体测定,发展前景诱人。

8.1　生物传感器的基本原理

8.1.1　生物传感器结构与原理

生物传感器是一类分析器件,它将一种生物材料(如组织、微生物细胞、细胞器、细胞受体、酶、抗体、核酸等)、生物衍生材料或生物模拟材料与物理化学传感器或传感微系统密切结合或联系起来,行使其分析功能[9]。传感原理如图 8.1 所示。

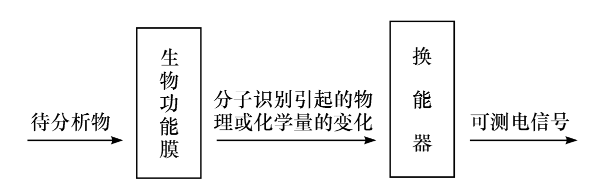


图 8.1　生物传感器的原理

生物传感器由“生物功能膜”和“换能器”两部分组成。待测样品中被分析物经扩散进入固定化生物功能膜层，通过固定化生物功能分子对待测分子的识别作用，发生生物学反应，引起某些物理量或化学量的信息变化，这些信息的变化经物理换能器或化学换能器转变成可定量和可处理的电信号，并经信号放大器放大后输出，得到待测物的分析量。

生物功能膜又称生物敏感膜(biosensitive membrane)或分子识别元件(molecular recognition element)，是生物传感器的核心器件，直接影响传感器的功能和质量。生物功能膜中固定的生物材料可以是酶、核酸、免疫物质、全细胞、组织、细胞器或它们的不同组合，近年来还引入了高分子聚合物模拟酶，使分子识别器件的概念进一步延伸。表8.1列出了生物传感器常用的分子识别元件。

换能器的作用是将生物学反应过程中产生的各种信息转变成可方便测量的电信号。生物学反应的信息是多元化的，包括各种生物、化学和物理信息，现代电子学、微电子学及传感技术的成果为检测这些信息提供了丰富的手段，为生物传感器的设计提供了足够的方法。可用作生物传感器的换能器件如表8.2所示[9]。

表8.1　生物传感器的分子识别元件

分子识别元件(生物敏感膜)	生物活性材料	分子识别元件(生物敏感膜)	生物活性材料
酶	各种酶类	免疫物质	抗体，抗原，酶标抗原等
全细胞	细菌、真菌、动物与植物细胞	生物亲和物质	配体，受体
组织	动物、植物的组织切片	核酸	寡聚核苷酸
细胞器	线粒体，叶绿体	模拟酶	高分子聚合物

表8.2　生物学反应信息与换能器

生物学反应信息	换能器选择	生物学反应信息	换能器选择
离子变化	离子选择性电极	光学变化	光纤，光敏管，荧光计
电荷变化	电容检测	界面电容改变	交流阻抗分析仪等
电阻变化、电导变化	阻抗计，电导仪	颜色变化(光学范畴)	光纤，光敏管
质子变化	场效应晶体管	质量变化	压电晶体等
气体分压变化	气敏电极	力变化	微悬臂梁
热焓变化	热敏电阻，热电偶	振动频率变化	表面等离子体共振

8.1.2　生物功能物质与分子识别

生物传感器的分子识别器件，主要是指来源于生物体的生物活性物质，包括

酶、抗原与抗体和各种功能蛋白质、抗体酶、核酸、催化性核酸、激素、微生物细胞、细胞器、动植物组织等,当它们被用作生物传感器的分子识别器件时,具有对靶分子(待检测对象)特异的识别功能。分子识别往往是生物体进行各种简单反应或复杂反应的前奏。分子识别能力决定生物传感器的选择性和灵敏度。因此,了解和掌握生物功能物质的性质及进行分子识别的特征,如酶促反应、免疫反应、核酸与核酸反应(杂交,hybridization)、离子在膜中的选择性传输及生物与药物、生物分子间弱相互作用等,对研究和开发生物传感器具有重要的指导意义。

8.1.3 生物学反应中的物理量变化

生物反应常常伴随一系列的物理量变化,如热焓、光、颜色、阻抗等,利用这些物理量变化能够设计一些精巧的传感装置。

1. 生物反应的热力学

任何生物学反应过程都伴随着热力学变化,如分子异构、分子间相互作用、生物催化反应等都会引起系统内部或外部的热变化。生物分子三维结构的改变会引起其功能变化,利用微量测热法测量分子结构转变过程或前后的热信息可以确定蛋白质结构的稳定性。目前已知核酸(如 DNA)的单链与双链结构是一个典型的热平衡现象,其他生化分子(如糖类和脂类分子)内的弱相互作用也与热有关。目前采用的量热仪(calorimetry)只需要很少的蛋白质或核酸样品就可以直接测得热焓和热容变化,并通过计算得出自由能和熵的改变。

生物分子之间的相互作用有多种形式,如蛋白质与其他生物分子相互作用可形成蛋白质-DNA、蛋白质-配体、抗原-抗体、酶-底物、酶-抑制剂等结合形式。分子间结合力是一种弱相互作用力,但这种识别具有高度的特异性。通过测定生物分子作用前后热焓的温度依赖性可以确定分子中结合位点的热容变化,阐述分子间特异性结合的特征和机制,并预测所检测的分子在不同条件下结合的特征。根据分子间相互作用后熵和热容的变化可以讨论蛋白质与其结合的配体的构象和水合作用的改变。而热焓变化则直接与结合组分的相互作用有关,并关联结构信息,这种结构信息的热力学分析对药物设计、功能蛋白的设计和阐述结合机制有重要意义[10]。

2. 生物发光

生物发光(bioluminescence)是指生物体内某些特殊物质在氧化过程中产生的发光现象。能够发光的生物主要有萤火虫、藻类、真菌、水母、虾和深海中的某些动物等。生物发光大多由荧光素酶(luciferase)催化,如萤火虫的 ATP 依赖性发光反应等。ATP 是生物体内的高能磷酸化合物,它在镁离子的作用下与虫荧光素

酶(E)和还原荧光素(LH_2)结合形成荧光素酶-荧光素-单磷酸腺苷的复合物($E-LH_2-AMP$)和焦磷酸盐(PP),该复合物再与氧结合产生 562 nm 波长的光($h\nu$)、水和荧光素酶-脱氢荧光素-AMP(E-L-AMP)。

$$E + ATP + LH_2 \xrightarrow{Mg^{2+}} E\text{-}LH_2\text{-}AMP + PP \qquad (8.1)$$

$$E\text{-}LH_2\text{-}AMP + O_2 \longrightarrow E\text{-}L\text{-}AMP + H_2O + h\nu \qquad (8.2)$$

反应过程中,放出的光量取决于 E、LH_2、O_2 和 ATP 浓度,当所有其他反应物过量时,反应发出的总光量和最大光强度与 ATP 的量成正比,并在 1 min 内达到最大光强度,总的发光效率可达 0.88(每个分子反应产生的光子数)。

3. 显色反应

生物反应过程中的颜色变化包括生物体内产生色素和生物体或酶与底物作用生成有色物质两个方面。色素是由不同的生物合成途径产生的,每一种途径都包含着若干生物化学反应,每一种反应都是由特殊的酶催化的。底物的显色反应范围十分广泛,如辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)能够氧化多种多元酚或芳香族胺,形成有颜色的产物;邻甲氧基苯酚被氧化生成橙色的沉淀、联苯二胺被氧化生成黄褐色的产物等。颜色是因为分子中存在发色基团,而这些基团对一定波长的光有吸收作用。一些重要的生物分子尽管不显示颜色,却有其特征吸收峰,如蛋白质的吸收峰为 280 nm,核酸的吸收峰为 260 nm。多数生物分子在可见光区的消光系数微不足道,但一旦与某些试剂定量地反应而生成有色产物,便能在可见光区获得特征吸收峰(表 8.3)。生物发光、颜色反应和光吸收变化是设计光生物传感器的基础。

表 8.3　几种物质的显色反应及吸收波长

物 质	显色试剂	吸光波长/nm
氨基酸	茚三酮	570,620
蛋白质	Folin，双缩脲	660,540
还原糖	二硝基水杨酸盐，碱性酒石酸盐	540
类固醇	乙酸酐，硫酸，三氯甲烷	625
核糖核酸	Biol 试剂	665

8.1.4　生物功能膜的制备

“重要的生命功能都是以生物膜为舞台而展现出来的”,没有生物功能膜就没有生物传感器。脂双分子层结构是生物膜特有的一种基本结构。各种生物膜,如细胞膜(质膜)、核膜、内质网、类囊体膜、溶酶体膜、神经膜和线粒体的内、外膜等上

的受体和离子通道在维持生物体的正常生理过程中具有重要意义，它们具有能量转换、物质运送、信息传递和分子识别等功能。这些生物膜都是由蛋白质和脂类分子经有序排列组成的，是生命体系的基本结构和生命活动的主要结构基础，有关研究已成为分子生物学中最令人瞩目和最活跃的研究领域之一。生物膜的模型从层数上来分可分为单层膜、双层膜和多层膜。单层膜主要是指 Langmuir-Blodgett (L-B)膜；脂双层膜包括平板双层膜(planar bilayer)和脂质体(liposome)，平板双层膜又可分为非支撑平板双层膜(又称黑膜，BLM)和支撑平板双层膜(s-BLM)；多层膜主要指磷脂铸膜(cast lipid film)。鉴于生物膜制备的复杂性，模拟生物膜的研究越来越受到人们的重视。

1. Langmuir-Blodgett(L-B)膜技术

L-B 技术可在分子水平上进行设计，按人们预想的次序排列和取向，制成分子组合体系，是实现"分子工程"的重要手段。利用 L-B 技术组装磷脂和蛋白质，仿制生物膜结构，研究生物膜在生物现象中的能量转移和物质传输过程中的各种功能，以揭示生命现象、探索模拟生物膜的应用，已在电化学和电分析化学中得到广泛应用。L-B 膜的制备方法简单，是一种人为控制的特殊吸附方法，其修饰电极的电化学行为与吸附分子有相似之处，如氧化还原峰基本上对称、无扩散因素的影响等。当电活性成膜分子垂直于电极表面，高度紧密有序取向时，L-B 膜因为分子间存在强烈的相互作用，氧化还原峰变宽，峰电位差增加。有时，电化学反应过程中需要中和膜内电荷，由于紧密排列，离子在膜中的传输受阻就可能成为电极过程的控制步骤，尤其当亲水的离子在含疏水的脂肪链的膜中传输时更为明显。这时，在一定条件下 L-B 膜修饰电极将表现出扩散控制的电化学行为。

L-B 膜修饰电极基传感器具有灵敏度高、响应速度快的特点。例如花生酸/花生酸乙酯和三甲基硬脂酰氯化物分别掺杂葡萄糖氧化酶修饰 H_2O_2 电极，可作为葡萄糖的传感器，其性能比传统的传感器更优越。镶嵌酶分子的硬脂酸 L-B 膜修饰到 H^+ 敏感场效应管的栅极，酶发生催化反应，可检测氢离子浓度变化，从而测定酶分子，这种抗生素传感器的性能已达到实用的要求。在刚处理好的金电极表面自组装一层硫醇，在此表面上构筑二甲基二(十八烷基)溴化铵(DODAB，一种人工磷脂)单层膜，将其放到缬氨霉素的溶液中培养，便可制备出对钾离子有选择性电容响应的传感器[11]。利用这一方法检测 K^+ 具有快速、简便的特点，可检测 5.0×10^{-8} mol · L^{-1} 的 K^+，线性范围为 $5.0\times10^{-7}\sim5.0\times10^{-3}$ mol · L^{-1}，检测限低于通常采用的其他电化学方法。将免疫球蛋白吸附在硬脂酸 L-B 膜修饰氧化铱薄膜电极上制成的免疫球蛋白抗体传感电极，可检测 $10^{-8}\sim10^{-6}$ mol · L^{-1} 范围内的抗体。L-B 膜修饰电极也用作离子通道传感器，改变膜的氧化还原状态，控制离子跨越膜的迁移。当膜处于电中性时，膜较紧密，疏水性较强，离子不易通过；膜

带有电荷时,离子就易通过。同时,改变膜层数可调节L-B膜修饰电极传感器的灵敏度和线性范围。

Langmuir-Blodgett技术用于葡萄糖和细菌传感器的研制已取得长足发展。将硬脂酸与聚-3-己基噻吩(P3HT)溶在氯仿中,用L-B技术固定葡萄糖氧化酶得到P3HT/SA/GOX膜,对葡萄糖在100～500 mg · dl^{-1}有线性响应[12]。同样,在涂有铟锡氧化物(ITO)电极上,用聚(3-十二烷基噻吩)P3DT代替P3HT,也可制备葡萄糖生物传感器[13]。利用L-B技术发展的沙门氏细菌生物传感器可用于环境样品的检测[14]。

2. 脂双层膜

平板双层磷脂膜(BLM)上的电化学研究源于Tien等[15]在20世纪80年代初所做的一系列开创性工作。他们最早用电子导体修饰BLM,在膜的两侧加入氧化还原电对分别作为电子的给体和受体,研究了BLM的电子转移。1989年,Tien等[16]又在新生的金属表面上成功地制备出支撑平板双层膜(s-BLM)。s-BLM最主要的优点是比BLM稳定,有实用价值,另外也适合于现场谱学研究。由C60掺杂的自组装s-BLM可以构造传感器探针,研究氧化还原反应和脂质双分子层间的光诱导电子转移[17]。C60掺杂的s-BLM可作为光敏二极管分子器件,产生光诱导的电荷分离。这一现象是由于底液-疏水脂质双分子层-水溶液界面的氧化还原反应。C60掺杂的s-BLM是很好的电子媒介体,在电化学生物传感器和分子电子器件方面具有重要应用。

以平板双层磷脂膜为基础的电化学生物传感器的研究和开发从20世纪90年代起得到了快速发展。BLM生物传感器可识别和测定许多生物活性物质,如葡萄糖、谷氨酸、细胞色素c等,已用于测定有机磷酸酯杀虫剂中的久效磷和氨基甲酸酯杀虫剂中的羧基呋喃[18],为农药残留物的检测提供了方便、快捷的方法。

3. 多层磷脂膜

多层磷脂膜的研究工作也引起了重视,比较出色的是Rusling小组的工作[19]。他们发现在热解石墨电极上的浇铸膜对血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素P450以及光合作用反应中心的直接电子转移有促进作用。

4. 固定化生物功能膜

固定化的主要目的是将酶等生物敏感元件限制在一定的空间而又不妨碍被分析物的自由扩散。与游离相生物材料相比,固定相生物材料具有热稳定性高、可重复使用和不需要在反应后进行催化物质与反应物质的分离等优点。常用的生物材料固定方法有:夹心法(sandwich)或隔离法(insulation)、包埋法(entrapment)、吸

附法(adsorption)、共价键合法(covalent binding)、交联法(cross linking)等,如图 8.2所示。

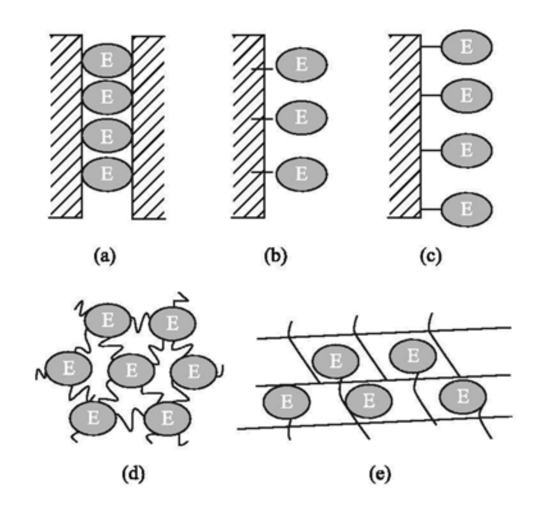


图 8.2　常用的生物材料固定方法

(a) 夹心法;(b) 吸附法;(c) 共价键合法;(d) 交联法;(e) 凝胶包埋法

1) 夹心法

夹心法将生物活性材料封闭在双层滤膜之间[图 8.2(a)],根据生物材料的不同而选择各种孔径的滤膜。这种方法的特点是操作简单,不需要任何化学处理,固定生物量大,响应速度较快,重现性较好,尤其适用于微生物膜和组织膜制作。商品 BOD 传感器的微生物膜就是用这种方法制作的。

2) 吸附法

吸附法是用非水溶性载体物理吸附或离子结合作用进行生物敏感元件的固定[图 8.2(b)],这些结合可能是氢键、范德华力或离子键、配位键等,也可能是多种键合形式共同发挥作用。

载体的种类繁多,如活性炭、高岭土、羟基石灰石、铝粉、金、硅胶、玻璃、胶原、壳聚糖、磷酸钙凝胶、碳纤维、纤维素和离子交换材料等。吸附的牢固程度与溶液的 pH、离子强度、温度、溶剂性质和种类以及酶浓度有关。

另一作用是疏水性吸附。如酶和蛋白质与非离子纤维素、塑料薄膜等有比较强的结合能力,已经在非均相酶免疫测定中广泛应用,但其材质较硬,不适宜作生物传感器膜。PVC 质软板薄,可切割,价廉,可以吸附可观的蛋白质量。

吸附法一般不需要化学试剂,对蛋白质分子活性影响较小。但蛋白质分子容

易脱落，特别是在环境条件改变时，故该方法常与其他固定化方法结合使用，如吸附交联法。

3）共价键合法

使生物活性分子通过共价键与不溶性载体结合而固定的方法称为共价键合法[图 8.2(c)]。这些载体包括纤维素及其衍生物、葡聚糖、琼脂粉、骨胶原、多孔玻璃、石墨等。共价键合有 3 种方式：①与载体直接反应连接；②通过同源双功能试剂与载体连接；③通过异源双功能试剂与载体连接后再与载体反应连接。该方法的特点是结合牢固，蛋白质分子不易脱落，载体不易被生物降解，使用寿命长。缺点是操作步骤较多，酶活性可能因为发生化学修饰而降低，制备具有高活性的固定化酶比较困难。

4）交联法

交联法是借助双功能试剂(bifunctional agent)使蛋白质结合到惰性载体上或使蛋白质分子彼此交联成网状结构的方法[图 8.2(d)]。双功能试剂具有两个功能基团，能与蛋白质中赖氨酸的 ε-氨基、N 端的 α-氨基、酪氨酸的酚基或半胱氨酸的巯基发生共价交联。可供交联的双功能试剂见表 8.4。这些交联试剂都含有两个相同的活性基团，因此又称为同质交联试剂，其中以戊二醛最为常用。

表 8.4　常用的双功能试剂

交联试剂	结构式
戊二醛	$OHC\text{-}[CH_2]_3\text{-}CHO$
环己烷二异氰酸酯	$OCN\text{-}[CH_2]_6\text{-}NCO$
N，*N*′-双顺丁烯二酰亚胺己烷	(马来酰亚胺)N$\text{-}[CH_2]_6\text{-}$N(马来酰亚胺)
双环氧己烷	$\underset{\backslash O/}{CH_2\text{—}CH}\text{-}[CH_2]_n\text{-}\underset{\backslash O/}{CH\text{—}CH_2}$
双亚胺甲酯	$H_3CO\text{—}C(=\!{}^{+}NH)\text{-}[CH_2]_n\text{-}C(=\!{}^{+}NH)\text{—}OCH_3$
双重氮联苯胺-2，2′-二磺酸	$N\equiv N^{+}\text{—}C_6H_3(R)\text{—}C_6H_3(R)\text{—}{}^{+}N\equiv N$

续表

交联试剂	结构式
甲苯基-2,4-二异氰酸酯	CH_3, NCO, NCO
2,4,6-三氯-三氮杂苯	Cl, Cl, N, N, N, Cl

5）凝胶包埋法

凝胶包埋法是将酶或细胞包埋并固定在高分子聚合物三维空间网状结构基质中[图 8.2(e)]。包埋法的优点是一般不产生化学修饰，对生物分子活性影响较小，膜的孔径和几何形状可任意控制，被包埋物不易渗漏，底物分子可以在膜中任意扩散；缺点是分子质量大的底物在凝胶网格内扩散较困难，因此不适合大分子底物的测定。

8.2　电子传递媒介体生物传感器

1984 年，美国分析化学杂志（*Analytical Chemistry*）刊登了第一篇关于利用电子传递媒介体促进酶与电极之间电子传递的研究报告[8]。在论文发表后的第 10 年（1994 年），该工作获英国皇家学会 Mullar 奖。他们的原创性贡献推动了一个领域的发展，已成为迄今生物传感器商品化最成功的支撑技术。

电子传递媒介体大致有两类：①生物体内的天然介体。如细胞色素类（氧化型/还原型，red/ox）、辅酶 NAD(P)/NAD(P)H、铁硫蛋白 III/铁硫蛋白 II 等。底物分子脱下的氢，经一系列中间传递体到达分子氧，每对中间传递体都能往复地接受氢或电子，以促进全部生物氧化过程的完成。②非生物源介体，包括一些酸碱指示剂、有机染料、金属络合物等。最常见的是苯醌（quinone）和二茂铁（ferrocene）。

良好的媒介体需具有低的氧化还原电势和高的电化学反应速率并且反应可逆，通常采用循环伏安法（cyclic voltammetry，CV）来考查介体的电化学性质。此外，pH、温度、氧浓度、酶抑制剂和一些干扰因子可能会影响媒介体的稳定性。

8.2.1　循环伏安法

循环伏安法通常采用三电极实验系统，即工作电极（working electrode）、对电

极(counting electrode)和参比电极(reference electrode)。工作电极可以用金、铂或碳电极等;对电极一般用铂网;参比电极为饱和甘汞电极或银/氯化银电极。电极在使用前须清洗,工作电极要用氧化铝粉抛光,对电极要用 1 mol·L^{-1} 硫酸在 −0.1~+1.1 V 之间反复清洗,直至其循环伏安图谱达恒定值,然后再用去离子水洗涤。伏安图谱用电化学分析仪分析记录。

图 8.3 为典型的 CV 图谱。以恒定速度对工作电极进行扫描,记录的电流 I 为电位 E 的函数。循环伏安法加电压方式与单扫描极谱法相似,是将线性扫描电压施加在电极上,电压与扫描时间的关系如图 8.3(a)所示。开始时,从起始电压 E_i 扫描至某一电压 E_m 后,再反向回扫至 E_i,成等腰三角形[图 8.3(a)]。通过循环伏安图,可以测得阴极峰电流 I_{pc} 和阳极峰电流 I_{pa}、阴极峰电位 E_{pc} 和阳极峰电位 E_{pa} 等参数。媒介体的标准式量电位 E^0(或半波电位 $E_{pc,1/2}$)可由($E_{pa}+E_{pc}$)/2 获得。对于具有 Nernst 响应的 CV(电化学可逆过程),在 25℃条件下,$\Delta E_p=|E_{pa}-E_{pc}|=59$ mV,为特征常数,与扫描速度无关,这时 $I_{pc}/I_{pa}=1$。

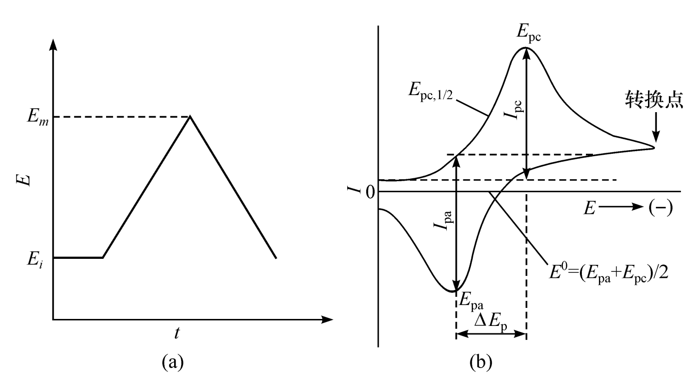


图 8.3　循环伏安法

(a) 电位与时间的关系,线性扫描电位扫至某电位值 E_m 后,再回扫至原来的起始电位值 E_i;(b) 典型的循环伏安图(CV),转换点为回扫的开始

8.2.2　电子传递媒介体生物传感器

电子传递媒介体生物传感器的反应过程可用图 8.4 表示。Cass 等[8]将 GOD 固定在石墨电极上,以水不溶性二茂铁单羧酸作为介体。在电极对葡萄糖的响应过程中,二茂铁离子作为 GOD 的氧化剂,并在酶反应与电极过程之间迅速传递电子。该传感器仅用较低的工作电压(0.22 V)就能使媒介体氧化(相比之下,H_2O_2 和 O_2 电极需要 0.6~0.8 V 的极化电压),因而减少了其他具有较低氧化还原电势物质干扰电极过程的机会。

电子传递媒介体生物传感器表面功能膜中固定的分子主要包括酶和媒介体。

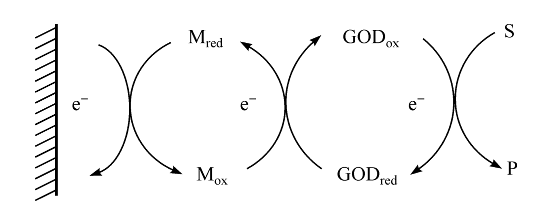


图 8.4　电子传递媒介体传感器的反应过程

由于电子传递媒介体相对分子质量一般都很小,与底物相对分子质量相似(如二茂铁为 186.03,苯醌为 108.09),所以难以用膜将媒介体滞留。一种解决的办法是增大媒介体分子,再用膜固定。如丁基二茂铁、戊基二茂铁和己基二茂铁。也可通过加入少量表面活性剂,使水不溶性介体形成胶束分散在水相中,胶束半径大约为 6 nm。分散胶束在金电极表面以高的电子交换速率进行电子传递。

8.3　无试剂生物传感器

电化学生物传感器根据其发展过程与响应机制可以分为三代:第一代为经典的电化学生物传感器,以 Clark 的酶电极为代表;第二代为电子传递媒介体生物传感器,解决了对氧的依赖和电极活性物质的干扰问题;第三代为直接电化学生物传感器或无试剂生物传感器。三代电化学生物传感器的区别见图 8.5。

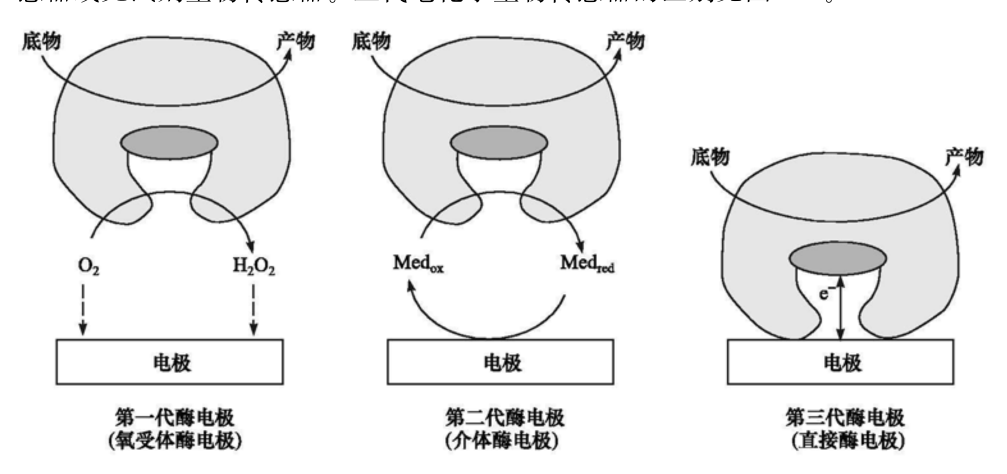


图 8.5　三代电化学生物传感器的响应机制

利用酶或蛋白质与电极之间的直接电子传递可以不需电子传递媒介体的存在就可获得对检测对象的传感分析。然而,大多数蛋白质的电活性中心包埋在蛋白质分子内部,距离电极较远,蛋白质分子直接吸附在固体电极表面上导致蛋白质分子部分变性,蛋白质分子在电极表面的不合适空间取向等均可导致直接电子传递

的效率降低或工作电位过高。电子传递媒介体修饰酶电极的出现克服了这一问题。但是,电子传递媒介体在酶的活性中心与电极之间穿梭传递电子是非特异性的,可能产生对检测的干扰。

无试剂电化学生物传感器采用特殊方法将蛋白质或酶分子直接固定在固体电极表面,使氧化还原活性中心充分暴露并与电极进行直接“交流”,加快了固定化分子与电极之间的电子传递速率,从而使电化学生物传感器的响应速度更快、灵敏度更高,成为真正的“无试剂分析”。这一方法的关键是实现蛋白质在电极上的直接电化学。

8.3.1　蛋白质在电极上的直接电化学

自从 Hill[21] 和 Kuwana[22] 首次在掺锡氧化铟电极上观察到细胞色素 c 的直接电化学性质以后,这种具有生物兼容性的半导体电极受到人们的广泛关注。Hill[21] 发现在含有 4,4′-二吡啶的溶液中,细胞色素 c 在金电极上可发生准可逆的电子传递,4,4′-二吡啶能吸附在金电极表面形成单分子层,加快细胞色素 c 的异相电子传递速率。目前已有数十种这种促进剂,它们一般都含有双官能团,其中一个官能团将促进剂固定在电极表面,另一官能团与蛋白质作用,使蛋白质在电极表面形成有利于电子传递的分子取向,加快电子传递速率。电极表面的清洁程度及蛋白质的纯度对其异相电子传递速率有很大的影响。Grealis 等[23] 利用 TiO_2 修饰 SnO_2 电极研究了细胞色素 c 在水溶液及甘油中的电化学性质,证实了溶剂的极性也严重影响细胞色素 c 的氧化还原性质。

已经发现银[24]、热解石墨和玻碳电极以及硅胶修饰氧化钛电极[25] 也是研究蛋白质直接电化学的良好材料。Tollin 等[26] 证实血红素类蛋白质在磷脂双层中的电子传递速率明显加快。磷脂双层能为血红素类蛋白质提供一个类似于其天然系统的微环境,从而加快蛋白质与电极之间的电子传递过程。Rusling 等[27,28] 将蛋白质固定在类生物膜中实现了蛋白质的直接电子传递。他们发现将血红素(Mb)包埋在一种表面活性剂——溴化二十二烷基二甲基铵(DDAB)中时,Mb 的异相电子传递速率比不存在 DDAB 时提高 1000 倍,同时 Mb 在磷脂膜、L-B 膜、DNA 膜中的电子传递速率也有不同程度的提高。此外,将血红蛋白包埋于含亚甲蓝的聚合物膜[29]、脂双层、聚丙烯酰胺-水凝胶、表面活性剂、黏土、DNA 修饰膜、SP 交联葡聚糖膜、鸡蛋卵磷脂膜和硅藻土膜中也实现了血红蛋白与电极之间的直接电子传递。这些材料为血红蛋白分子提供了一个类似于其生物膜的微环境[28],加快了血红蛋白分子与电极之间直接的、化学可逆的电子交换反应,因而避免了电子传递媒介体的使用。

8.3.2　蛋白质在金胶纳米粒子修饰电极上的固定与直接电子传递

常用于蛋白质固定的纳米粒子是柠檬酸根稳定的金胶纳米粒子。它在电极表

面的自组装方法有两种，即静电吸附自组装方法和共价键合自组装方法。静电吸附自组装方法是利用金胶纳米粒子表面柠檬酸根的负电荷与带正电荷的电极表面之间的静电作用；而共价键合方法是依靠纳米金表面与电极表面的功能化基团（如—SH、—NH_2、—CN）形成的 Au^0—S 键，其组装步骤包括如图 8.6 所示的在一个电极表面上构建一个功能化单层。这种自组装单层很稳定，即使反复冲洗也不会从电极表面上洗脱下来，它为具有氧化还原活性的自组装单层提供了一个活性界面。胶体金的多层自组装超级结构可通过一个交联剂与带负电荷的金胶纳米粒子之间的反复相互作用而获得。这种方法已经被用来制备双金属的超级结构如Au/Ag的有序排列。当一个含有两个巯基尾端的物质被用作构建金纳米粒子的多层超级结构时，采用的方法通常是化学键合的方法。

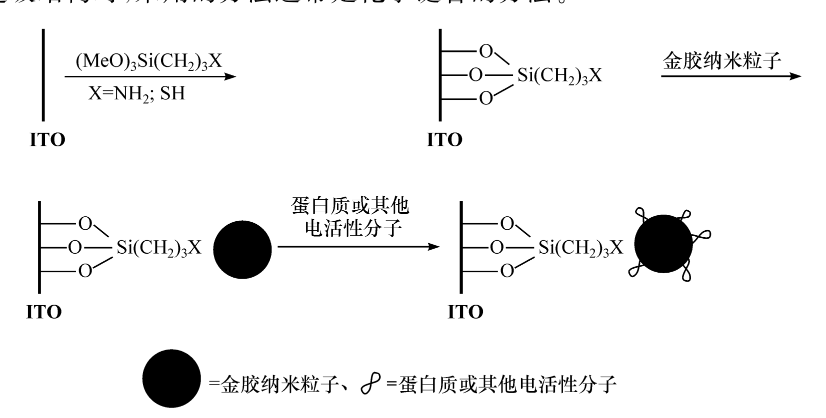


图 8.6　胶体金纳米粒子单层的组装和蛋白质在 ITO 电极上的固定

同样，金电极表面也能通过 Au^0—S 键用半胱氨酸实现功能化[30,31]。如图 8.7 所示，半胱氨酸单层上的氨基尾端可进一步与戊二醛分子中的一个醛基键合，而戊二醛分子中的另一个醛基继续与溶液中的半胱氨酸分子的氨基尾端键合，从而使金电极表面修饰单层的尾端带上巯基，再通过金胶纳米粒子与尾端巯基形成 Au^0—S 键即可构建金胶纳米粒子修饰金电极。为了缩短金电极与金胶纳米粒子之间的空间距离，陈洪渊[31]将经半胱氨酸功能化后的金电极直接放在金胶溶液浸泡，利用半胱氨酸的氨基尾端与金纳米粒子之间形成的 Au^0—N 键将金胶纳米粒子直接固定在功能化的金电极表面。将已经修饰过金胶纳米粒子的电极在蛋白质溶液中浸泡，利用表面带负电荷的金纳米粒子与蛋白质表面带正电荷的基团之间的静电相互作用可使蛋白质牢固地吸附在电极表面。

将蛋白质包裹的金胶纳米粒子电沉积在镀铂[32]或碳糊[33]电极上，在电极表面可得到蛋白质/金胶纳米粒子的修饰膜。电沉积过程与施加的电压、金纳米粒子的浓度、粒子的尺寸以及不同的电极材料等因素有关。将金胶纳米粒子与碳糊相混

$\xrightarrow[\text{水溶液}]{HS(CH_2)_2NH_2}$ S–$(CH_2)_2$–NH_2 / S–$(CH_2)_2$–NH_2 / S–$(CH_2)_2$–NH_2 $\xrightarrow[\text{pH8.1 PB}]{OHC–(CH_2)_3–CHO}$ S–$(CH_2)_2$–N=CH–$(CH_2)_3$–CHO / S–$(CH_2)_2$–NH_2 / S–$(CH_2)_2$–N=CH–$(CH_2)_3$–CHO $\xrightarrow[\text{水溶液}]{HS(CH_2)_2NH_2}$

S–$(CH_2)_2$–N=CH–$(CH_2)_3$–CH=N–$(CH_2)_2$–SH / S–$(CH_2)_2$–NH_2 / S–$(CH_2)_2$–N=CH–$(CH_2)_3$–CH=N–$(CH_2)_2$–SH $\xrightarrow{\text{胶体金溶液}}$ S–$(CH_2)_2$–N=CH–$(CH_2)_3$–CH=N–$(CH_2)_2$–S● / S–$(CH_2)_2$–NH_2 / S–$(CH_2)_2$–N=CH–$(CH_2)_3$–CH=N–$(CH_2)_2$–S●

$\xrightarrow[\text{o(蛋白质)}]{\text{蛋白质溶液}}$ S–$(CH_2)_2$–N=CH–$(CH_2)_3$–CH=N–$(CH_2)_2$–S● / S–$(CH_2)_2$–NH_2 ● / S–$(CH_2)_2$–N=CH–$(CH_2)_3$–CH=N–$(CH_2)_2$–S●

图 8.7　辣根过氧化酶/金胶/半胱氨酸修饰金电极的制备过程

合，可制备金胶修饰碳糊电极，该方法结合了金胶纳米粒子与碳糊技术的优点[34～38]。蛋白质在金胶修饰碳糊电极表面上的固定可通过将蛋白质包埋在金胶碳糊的混合物中或将蛋白质溶液滴在预先处理好的金胶修饰碳糊电极表面或将金胶修饰碳糊电极在滴有蛋白质溶液的玻璃片上抛光来实现。

金胶纳米粒子能加快固定化氧化还原蛋白质与电极表面之间的电子传递且不需要使用任何电子传递媒介体或促进剂，因而为制备无试剂生物传感器(如过氧化氢)或其他生物分子的传感器提供了新途径。溶液中的血红素类蛋白质细胞色素 c 在金胶纳米粒子自组装 SnO_2 电极上呈现出一对可逆的氧化-还原峰，而在裸 SnO_2 电极表面却未发现细胞色素 c 的任何电化学信号。纳米粒子的表面形貌、与电极表面的距离是影响血红素类蛋白质与电极之间直接电子传递的重要因素。

金胶纳米粒子表面与平面裸金电极的表面性质有很大差异，尽管金胶/蛋白质/电极之间的相互作用还不是十分清楚，但是金胶能加快氧化还原蛋白质与电极之间的电子传递这一实验事实仍可以用下列几种方式形象地进行说明。首先金胶纳米粒子具有很高的比表面积，表面能保持生物活性，因此能与蛋白质分子发生强烈的相互作用。小尺寸的金胶纳米粒子(约 30 nm)能给蛋白质分子提供更自由的取向，增加了蛋白质的磷酸盐骨架靠近金属粒子表面的可能性，缩短了蛋白质分子与金属粒子表面之间的电子传递距离，从而有利于电子传递反应的发生。金胶纳米粒子能够充当蛋白质分子的磷酸盐骨架与电极表面之间的电子传输通道，因而加快了电子传递的过程。蛋白质与金胶纳米粒子表面的强烈相互作用将导致金胶粒子表面上吸附的蛋白质的密度增加，以至于一些本来受到限制的方位也能适合于蛋白质分子与导电性物质实现在表面的直接电子传递。

8.3.3　纳米粒子在无试剂生物传感器制备中的应用

利用金胶纳米粒子构建电化学传感器件具有广阔的前景。带负电荷的金胶纳

米粒子表面能为蛋白质分子提供一个特殊的、具有生物兼容性的微环境，这将导致蛋白质与其处于天然状态时一样，能与底物分子发生特殊的具有选择性的相互作用。一些基于蛋白质在金胶纳米粒子上的固定而发展起来的生物传感器已成功用于过氧化氢、亚硝酸盐、葡萄糖和苯酚的测定。同时，应用金纳米粒子的自组装超级结构制备的生物传感器引起了人们的兴趣。Natan 等[39]已经确认在该超级结构的多层膜中金纳米粒子与功能化基团（如—CN、—NH_2 和—SH）是通过共价键合方式结合在一起的，金纳米粒子的三维有序排列确保了固定化的蛋白质的电子传输，使其不需要添加额外的电子传递媒介体就能应用于电化学传感。Willner 等[40]利用纳米粒子上的微过氧化物酶交联剂在透明的 ITO 导电玻璃基体上成功地组装了一个多层排列的金纳米粒子超级结构，发展了一种新型过氧化氢传感界面。Dong 等[41]利用 3-巯基丙基-三甲基硅氧烷溶胶-凝胶将金纳米粒子固定在其网格内及表面上，并在金纳米粒子表面上吸附 HRP 分子，构建了自组装纳米粒子生物传感器，固定化的 HRP 具有直接的电化学行为，对过氧化氢的还原具有快速的电催化响应及灵敏的安培响应。该生物传感器可通过控制巯基聚合膜或溶胶-凝胶的厚度以及与电极相连的金纳米粒子的层数来有效地控制其电催化过程。这些工作为金胶在蛋白质固定及其生物传感方面的应用开辟了非常广阔的应用前景。

由于金属锆及其化合物对氧原子或含氧基团具有特殊的亲和作用[42]，且通过这种作用使其有可能与生物分子结合[43]，这一性质引起了人们对金属锆及其化合物的电化学行为和应用研究的兴趣。例如，锆磷酸盐（ZP）是一种熟知的强酸性离子交换剂，也是一个良好的离子导体，已经广泛地被用来作为电子传递媒介体加速酶与电极之间的电子传递。二氧化锆纳米粒子也能加速血红蛋白与电极之间的电子传递，固定化血红蛋白对过氧化氢的还原具有较高的电催化活性和很好的热稳定性[44]。

目前，其他纳米粒子如黏土、蒙脱土、多孔铝和 NaY 分子筛等无机多孔材料已被用于蛋白质固定和直接电化学研究。其中分子筛因为具有规则的尺寸和空腔以及选择性、吸附性和催化能力而引起了人们的关注，其独特的结构和催化性质能为电子传递提供合适的环境，并防止生物分子的失活。但是分子筛的孔径太小且含有亲水性的铝，蛋白质和酶只能在其外表面吸附，需要引入表面活性基团来键合蛋白质和酶，这样就不能够发挥分子筛独特的孔道作用，且铝的存在使孔内和表面的空位都能吸附水，不利于蛋白质和酶的固定。六方介孔硅（HMS）的介孔分子筛比微孔分子筛有大得多的孔径，可以把蛋白质和酶有效地固定在电极表面，纳米级孔道大小可通过表面活性剂、辅助的反应物以及反应条件来调节。由于它具有大的表面积、疏水性以及可任意调变的孔道尺寸，使得这种材料在多方面的用途已得到开发[45]，大孔可使蛋白质和酶进行有效的电荷传递，因而克服了微孔分子筛在固定蛋白质和直接电化学研究方面的缺点。鞠熀先等[46]将辣根过氧化物酶（HRP）

固定在六方介孔硅修饰的玻碳电极上，观测到了HRP的直接电化学，用FTIR、N_2吸附等温线和电化学方法研究了HRP和HMS之间的相互作用。基于HMS独特的孔道性质，固定在HMS上的HRP显示出良好的电化学行为，其电活性中心Fe(Ⅲ)/Fe(Ⅱ)出现两对氧化还原峰，其中电位较负、电流响应较大的氧化还原峰对应于进入孔道内部的HRP，而电位较正、电流响应较小的氧化还原峰则对应于吸附在外表面的HRP，式量电位分别为−0.315 V和−0.161 V。嵌入孔内的HRP的量和介孔材料的孔内径以及溶液的pH有关，电极过程为一个质子参与的表面控制过程。由于HMS的比表面积很大，嵌入的HRP分子多，所以被固定的HRP对过氧化氢的还原具有良好的电催化作用，测定过氧化氢时达到稳态响应的95%仅需5s，固定化HRP具有很好的生物亲和性。将肌红蛋白(Mb)[47]和血红蛋白(Hb)[48]固定在六方介孔硅修饰的玻碳电极上也可显示直接电化学性质和很好的稳定性，被固定的Mb和Hb均对过氧化氢和NO_2^-的还原具有好的催化作用，可用于构建过氧化氢和NO_2^-的传感器，后者测定过氧化氢和NO_2^-的检测限分别为1.86×10^{-9} mol·L^{-1}和6.11×10^{-7} mol·L^{-1}。将细胞色素c固定在介孔材料上可对过氧化氢浓度在0.07～5.0 mmol·L^{-1}有线性响应，并显示出Michaelis-Menten响应[49]。

8.4　生物传感器的应用

8.4.1　生物传感器的临床诊断

1. 血糖测定

随着人类生活水平的提高，糖尿病及各种代谢综合征的发病率逐年增加，并正成为21世纪威胁人类健康的主要疾病。通过血液葡萄糖的测定可为临床上诊断和控制糖尿病和许多代谢综合征的发生和发展提供依据。正常人血糖的含量为80～120 mg·L^{-1}(或3.9～6.1 mmol·L^{-1})，尿糖为大于160 mg·L^{-1}，而糖尿病患者的血糖水平可达500～600 mg·L^{-1}。在各种血糖测定方法中，电化学生物传感器以其准确快速的特性和低的测定成本而具竞争性。

在氧气存在情况下，葡萄糖经葡萄糖氧化酶(GOD，EC 1.1.3.4)催化氧化生成过氧化氢和葡萄糖酸内酯，因此可以通过测定氧的消耗(氧电极)或过氧化氢的生成(过氧化氢电极)来测定葡萄糖的含量。最早的电化学葡萄糖生物传感器就是Updike设计的GOD电极[50]，用聚丙烯酰胺凝胶固定葡萄糖氧化酶，并与氧电极结合，用于葡萄糖测定。但由于酶的渗漏使酶电极不能有效地长时间工作。为有效地固定GOD，众多的研究者做了大量的工作，先后尝试了聚乙烯碳酸酯膜和多孔膜包埋法、重氮化法、牛血清白蛋白-戊二醛交联法等，其酶活力回收和稳定性都

能达到实用化要求，其中用 BSA-戊二醛交联法固定 GOD，传感器可稳定 4 个月。然而正如预期的那样，由于基础电极为氧电极，实验中也观察到氧的干扰。这种干扰在进样量微小时可忽略不计，但在进样量为 100 μl、样品氧分压低于 80%饱和度时，干扰便不可忽视。

为了避免氧干扰，许多研究者采用过氧化氢电极作为基础电极。它的优点是：葡萄糖浓度与产生的过氧化氢的量有定量关系，不受血液中氧浓度变化的影响；酶电极输出电流与产生的过氧化氢的量成正比，测定开始时残余电流低，因此响应灵敏度很高。与此相反，以氧电极作基础电极时，对葡萄糖的响应是一个电流不断降低的过程，起始电流大，故灵敏度较小。两者比较起来，用过氧化氢电极制作的 GOD 电极灵敏度可高出两个数量级。1972～1975 年，美国 Yellow Springs 仪器公司(YSI)研制的第一个商品葡萄糖分析仪(YSI Glucose Analyzer Model-23)就是采用这种形式制成，其电极反应过程如下：

$$\text{分析物} + O_2 \longrightarrow H_2O_2 + \text{产物} \tag{8.3}$$

$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^- \tag{8.4}$$

迄今，葡萄糖酶电极测定仪已经有各种型号的商品，并在许多国家被普遍应用。1986 年，Wollenberger[158]报道了一种能消除抗坏血酸干扰的双酶电极。他将 GOD 和漆酶与明胶混合在聚氯乙烯基质上固化成膜，然后装在 H_2O_2 电极表面并覆盖半透膜。在反应池中加入六氰化铁(III)，六氰化铁(III)从干扰物质中获得电子生成六氰化亚铁(IV)，从而消除了干扰物质的影响。

利用金胶纳米粒子上吸附的 GOD 中 FAD 基团的直接电化学可对葡萄糖进行电化学检测。在金胶碳糊混合物表面的 GOD 与电极之间的直接电子传递反应在溶解氧存在时的反应如式(8.5)和式(8.6)。溶解氧的存在使 GOD/Au/CPE 上 GOD 直接电子传递的循环伏安曲线形状剧烈改变，还原峰电流显著增加而氧化峰电流减小，表现出对溶解氧还原的电催化响应。向空气饱和的 PBS 缓冲溶液中加入 β-D(+)-葡萄糖溶液，还原电流降低，且随着 β-D(+)-葡萄糖浓度的增加还原电流降低的数值增加，如图 8.8 所示。

$$\text{GOD(FAD)} + 2e^- + 2H^+ \rightleftharpoons \text{GOD(FADH}_2\text{)} \tag{8.5}$$

$$\text{GOD(FADH}_2\text{)} + O_2 \longrightarrow \text{GOD(FAD)} + H_2O_2 \tag{8.6}$$

溶液中存在有葡萄糖时，由于葡萄糖氧化酶的氧化形式 GOD(FAD)可与葡萄糖分子发生下列酶促反应：

$$\text{葡萄糖} + \text{GOD(FAD)} \longrightarrow \text{葡萄糖酸内酯} + \text{GOD(FADH}_2\text{)} \tag{8.7}$$

使反应(8.5)受到遏制，电催化电流减小。基于这种电催化响应的减小，可进行葡萄糖的测定[37]。传感器响应的线性范围为 0.04～0.28 mmol · L^{-1}，检测限为 0.01 mmol · L^{-1}，对 β-D(+)-葡萄糖检测的灵敏度为 8.4 μA mmol · L^{-1}。在葡萄糖浓度 0.1～0.3 mmol · L^{-1} 范围内，连续 8 次测定的回收率在 97.3%～

103.2%。0.16 mmol · L^{-1}的尿酸或 0.36 mmol · L^{-1}的抗坏血酸存在时将引起还原电流分别增加 3.3%或 5.1%,对传感器的电流响应很难引起干扰。

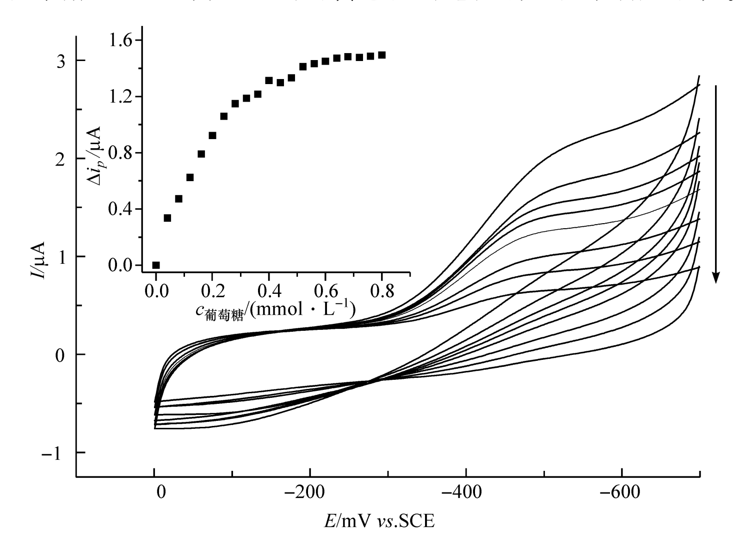


图 8.8　向 0.1 mol · L^{-1} pH 5.0 空气饱和 PBS 缓冲溶液中连续添加 0，0.04，0.08，0.12，0.16，0.20，0.28 和 0.44 mmol · L^{-1} β-D(+)-葡萄糖溶液的循环伏安图

扫速 50 mV · s^{-1}。插图：−0.5 V 下的催化电流与葡萄糖浓度关系

该方法与通过测定氧气的消耗量或过氧化氢的生成量的葡萄糖安培传感器相比,大大降低了阳极过电位,排除了可被氧化的共存物质,如抗坏血酸和醋氨酚的干扰。

最近,夏兴华等还用多孔氧化铝膜制备了高比表面积的铂纳米管阵列传感界面,利用干扰物质与葡萄糖在铂纳米管阵列上不同的电化学反应机制,实现了对葡萄糖的选择性检测[51,52]。

葡萄糖氧化酶可在碳纳米管上均匀、稳定地吸附,同时碳纳米管对溶解氧的还原具有催化作用。基于葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化过程中对氧气的消耗,可以对葡萄糖进行检测,稳态安培响应如图 8.9 所示。该传感器在 8 s 内电流达到 95%的稳态响应,线性上限达 5 mmol · L^{-1},检测限为 58 μmol · L^{-1},灵敏度随层数的增加而增加,并在第 5

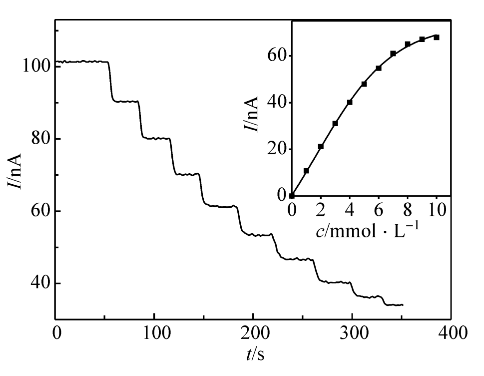


图 8.9　葡萄糖氧化酶/碳纳米管基葡萄糖传感器的安培响应

工作电位−0.2 V

层达到最大。由于采用低的检测电位,抗坏血酸和尿酸对葡萄糖的测定没有干扰[53]。该方法无需媒介体或半透膜就可高灵敏地检测葡萄糖。

2. 乳酸测定

乳酸是肌肉连续活动的代谢产物,乳酸的过多积累意味着疲劳。乳酸的测定有利于基础代谢研究和运动生理研究。许多垂危患者因反常的呼吸、血液循环或代谢而发生酸中毒。代谢紊乱会导致血浆中乳酸积累及动脉血管萎缩,测定血液中的乳酸含量能够鉴别乳酸中毒和其他酸中毒。此外,测定脑脊液中的乳酸浓度有助于区分病毒性脑膜炎和化脓性脑膜炎。乳酸在血液中的浓度和在体液中的浓度一般应分别低于 2.7 mmol • L^{-1} 和 1.2～2.1 mmol • L^{-1}。

有 4 种酶适合于制备传感器而用于乳酸的电化学测定,它们是乳酸脱氢酶(LDH)、细胞色素 b_2(Cyt b_2)、乳酸氧化酶(LOD,EC 1.1.3.2)和乳酸单加氧酶(LMO)。其测定原理如图 8.10 所示。

LDH 反应的产物 NADH 可以直接在还原电极的阳极上被氧化,从而产生电流[54],但这种方式需要辅酶(NAD^+),故不太适用。LMO 反应可以与 Clark 氧电极结合,对人血清中乳酸线性响应。Cyt b_2 催化生成的$[Fe(CN)_6]^{4-}$用铂电极测定,反应时间约 1 min,可定量 0.05～7 mmol • L^{-1} 的乳酸。

将 LOD 吸附在多孔性乙酸纤维素膜上,使之与氧电极组合,再覆盖透析膜构成酶电极,可定量测定$(0.05～0.8)\times10^{-4}$ g • ml^{-1} 的乳酸[55]。

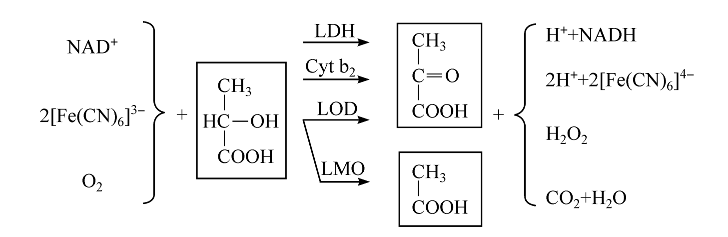


图 8.10　乳酸生物传感器工作原理

乳酸测定仪是迄今最成功的商品酶电极,瑞士的 La Roche 公司、日本OMRON Tateisi 电子公司和美国 YSI 公司从 1976 年来相继开发出产品。Roche 公司的乳酸分析仪 640 型采用 Cyt b_2-铂电极反应原理,每小时测定 20～30 份血样,精度为 5%,与光学乳酸分析法相关系数为 0.990。OMRON 公司和 YSI 公司乳酸分析仪均采用 LOD 反应,基础电极为 H_2O_2 电极,于 1983 年开发出产品。OMRON HER100 型分析精度小于 5%,酶电极可稳定工作 13 天。YSI23L 型需要样品 25 μl,线性范围在 15 mmol • L^{-1} 以内,每小时测定 42 份样品。

Mascini 等[56]在人工胰脏体内研究中用了 LOD 酶电极和 GOD 酶电极,以研

究糖尿病患者身体对输注葡萄糖和胰岛素的不同反应，这项研究对糖尿病患者的外科手术中的输液控制十分有帮助。

3. 尿素及尿酸测定

血液中的尿素浓度是评价肾功能的指标，临床上用尿素氮(BUN)表示，正常值为 3.6～8.9 mmol · L^{-1}。尿素经脲酶水解为氨和二氧化碳：

$$(NH_2)_2CO + H_2O \xrightarrow{\text{脲酶}} 2NH_3 + CO_2 \tag{8.8}$$

产生的 NH_3 在水中进一步转变成 NH_4^+，使溶液的 pH 上升。可以选择氨敏电极、CO_2 电极或 pH 电极作为基础电极，因此尿素电极大多数属于电位型电极，其响应值与尿素浓度的对数值符合 Nernst 关系。用氨电极为基础电极时，对尿素的理论响应斜率约为 59 mV · mol^{-1} 数量级。用 BSA-戊二醛交联法固定脲酶，与氨电极组成传感器，对尿素响应线性范围为 5×10^{-5} ～ 5×10^{-2} mol · L^{-1}，可使用 1000 次[57]。若在脲酶溶液中加入 EDTA 作为稳定剂，可以获得高灵敏度的脲酶电极，响应斜率可达 90.7 mV · mol^{-1} 数量级，即为超 Nernst 响应。

尿酸是核酸中嘌呤分解代谢的终产物，正常值为 2～7 mg · dl^{-1}，尿酸测定对于诊断痛风十分有帮助。在分子氧存在下，尿酸经尿酸氧化酶氧化成尿素、过氧化氢和二氧化碳。

第一支尿酸酶电极是用 BSA-戊二醛交联尿酸氧化酶[58]，然后与氧电极组成的。需要样品 500 μl，线性范围至 0.5 mmol · L^{-1}，操作 100 天剩余活力为 70%，分析精度为 9%，与光度法相关系数为 0.985，可以使用 1000 次。也有的采用电位法，在 CO_2 电极上用羟乙基纤维素固定尿酸氧化酶，对尿酸的响应活性至少维持 10 天，测定电位仅漂移 2 mV 左右[59]。

4. 谷氨酸丙酮酸转氨酶(GPT)测定

血清转氨酶活力对诊断病毒性肝炎和中毒性肝炎及了解肝细胞损害程度有重要参考价值，正常值为 0～25 单位。GPT 催化如下反应：

$$\text{L-丙氨酸} + \alpha\text{-酮戊二酸} \xrightarrow{\text{GPT}} \text{丙酮酸} + \text{L-谷氨酸} \tag{8.9}$$

生成的丙酮酸经丙酮酸氧化酶进一步催化：

$$\text{丙酮酸} + H_3PO_4 + O_2 \xrightarrow{\text{丙酮酸氧化酶}} CH_3OPO_3H_2 + \text{乙酸} + CO_2 + H_2O_2 \tag{8.10}$$

将一定量的血清样品与过量的 L-丙氨酸和 α-酮戊二酸混合保温，用丙酮酸氧化酶与氧电极组成的酶电极测定反应前后的丙酮酸含量，便能达到测定 GPT 的目的。酶电极对丙酮酸的检测下限为 0.06 mmol · L^{-1}，线性范围至 0.8 mmol · L^{-1}，重现性为±4%；测定 GPT 活力线性范围为$(0.5\sim180)\times10^{-3}$ IU · ml^{-1}，信噪比

为5,检出下限为0.5×10^{-3} IU·ml^{-1}。当GPT活力为11.7×10^{-3} IU·ml^{-1}时,测定的重现性为±6%。对人血清GPT进行测定,与分光光度法的相关系数为0.99,酶电极工作10天、100次后活力损失30%[60]。

5. 免疫传感器

免疫分析(immunoaasay)主要是基于抗体(或抗原)作为选择性化学试剂来分析测定抗原(或抗体)及半抗原的一种高选择性、高灵敏性的方法,它的提出及发展是生物分析化学伟大的成就之一。对于低含量样品,不论从灵敏度、花费,还是从分析时间和可操作性方面考虑,免疫分析都成为首选的方法。将高灵敏度的传感技术与特异性免疫反应结合起来,用以监测抗原-抗体反应的生物传感器称作免疫传感器。免疫传感器是生物传感器的一大分支,是一种能够连续可逆地感受化学量和生物量变化的装置,它利用抗体-抗原反应的高亲和性和分子识别能力,具有实时输出、分析灵敏度高、特异性强、使用简便且成本低的优点,在生物学技术及临床诊断、食品工业、环境监测与处理等许多领域得到广泛应用。

与其他生物传感器结构类似,免疫传感器具有三元复合结构,即感受器、转换器和电子放大处理器。在感受器单元中,抗体与配基的选择性结合产生的信号被敏感地传送给感受器,当待测物质经过具有分子识别的接受器时,传感器所感受的化学量由信号转换器将其转化成与分析物浓度有关的电信号或光信号输出,通过电子系统进行处理和显示。常用的信号转换器有电化学电极、离子敏场效应晶体管、热敏电阻、石英晶体微天平、光纤等。传统免疫测试法大多定性或半定量地判断,一般不能对整个免疫反应过程的动态变化进行实时监测。免疫传感器具有能将输出结果数字化的精密换能器,不但能达到定量检测的效果,而且由于传感与转换能同步进行,能实时监测到传感器表面的抗原抗体反应,有利于对免疫反应进行动力学分析。因此,它可促使免疫诊断方法向定量化、操作自动化方向发展。

1)免疫传感器制备

免疫传感器制备过程中一个非常重要的步骤是抗体或抗原在传感器表面的固定。抗原抗体的固定方式、数量及活性等直接影响传感器的重现性、检测限及循环使用等性能。然而传感器表面结构不一,有金属(如金、银、铜、铂、铅、锂、钛、镍或铬)、碳、玻璃、石英等,它们与抗原或抗体的结合特性不同,这就需要用不同的固定方法,使得固定好了的抗原或抗体不会在反应中脱落。常用的固定方法包括:①吸附法(直接法):用含抗体或抗原的溶液涂覆或浸泡电极,通过物理或化学吸附作用使其表面生成具有识别功能的生物膜。该法简单、快速,但易阻碍特异性反应的发生,导致非特异性吸附和脱落。②架桥化固定法(交联法):用戊二醛等与蛋白质分子相互结合,起到桥梁的作用,从而使抗原(抗体)固定于电极表面。③包埋法:包

括高分子载体包埋法、电聚合高分子包埋法、碳糊固定法。高分子载体包埋法是将抗原(或抗体)与合成高分子,如 Nafion 或生物高分子丝蛋白经溶剂混合而使抗原抗体包埋于其中,制成具有生物活性的感应膜,再将其覆盖到电极表面构成免疫传感器;电聚合高分子包埋法是将单体和抗原(抗体)同时混合于电解液内,通电使单体在电极表面电聚合成高分子,与此同时将抗原(抗体)包埋于高分子膜内,直接固定于电极表面,构成免疫传感器;碳糊固定法是将抗原(抗体)用石蜡油等溶剂调匀,再加入石墨粉调制成糊状物,填充于玻璃管内制备成碳糊免疫电极。④共价键合法:最常用的是聚乙烯亚胺(PEI)法、硅烷化(APTE)法、生物素-亲和素体系法、牛血清白蛋白(BAS)和葡萄球菌 A 蛋白(SPA)法。其中 SPA 法效果最好,但它只限用于固定抗体。⑤分子自组装固定法:利用自组装技术和 L-B 膜技术等,在金电极表面先修饰一层硫醇类化合物,然后再通过自组装方法将媒介体和抗体(抗原)一层层固定到电极表面,构成免疫传感器。

为防止传感器表面生物膜再生时可能导致的膜中蛋白质活性降低的问题,近年来,一次性使用和可更新的安培免疫传感器得到了迅速发展,推动免疫传感器向简便、快速和自动化发展提供了一种具有前景的途径。一次性安培免疫传感器的制备经常采用平版印刷技术、刻印技术、喷涂技术等。这种一次性使用的免疫传感器的最大优点是成本低,能够实现批量生产。Wang 等[61]将含有兔 IgG、石墨粉的溶胶-凝胶溶液用印记技术直接喷涂在玻璃片上,制备成一种用于兔 IgG 测定的一次性安培免疫传感器。可更新的安培免疫传感器采用包埋技术,将抗原(抗体)、碳粉(石墨粉)、载体材料混合均匀并压入 PVC 管或玻璃管中,一次免疫分析后,挤压去掉传感器最外层生物组分,通过简单的抛光,得到一个新的免疫组分层用于下一次免疫分析。常用的载体材料有环氧树脂、刚性导电聚合物、磁性颗粒、高分子聚合物等,由这些载体材料制备的传感器的物理和化学性能均较好,具有比较低的背景电流和宽的工作电位范围。Sole 等[62]将抗体固定于磁性颗粒上,采用类似流动注射的方法,制备了一种可更新的安培免疫传感器。Santandreu 等[63]则将石墨粉、兔 IgG、甲基丙烯酸甲酯或者环氧树脂混合、熟化,制备了一种用于兔 IgG 测定的可更新安培免疫传感器。

2) 电化学免疫传感器

电化学免疫传感器是免疫传感器中研究最早、种类最多,同时也是较为成熟的一个分支,它结合了各种电分析技术,如溶出伏安法、脉冲伏安法、脉冲差分法等。按测量信号电化学免疫传感器可分为电位型、电容型、电导型、阻抗型和电流型等。其中电流型(安培型)免疫传感器最为成熟。Janata[64]利用 PVC 膜固定 ConA 制备的电位型传感器在聚甘露糖中温育后,可通过传感器上电位的变化直接测定抗原抗体间的结合。Newman 等[65]将相互交叉的铜电极固定在玻璃表面,用二氧化

硅隔离各铜电极并固定抗原，再用聚对二甲苯层覆盖电极。该传感器可通过电容降低直接测定相应的抗体。电容免疫传感器是无标记的，基于双电层电容因分子识别作用而发生变化。通常生物分子都具有电荷，当通过特异亲和力接到电极表面时引起双电层电容的变化，借此可以测定反应物的浓度。值得注意的是，它可通过连续监测电容的变化来研究在电极表面发生的反应动力学过程，从而研究分子之间的相互作用。

免分离免疫分析方法也非常引人注目，由于无需洗涤步骤，特别适合于野外测定。一种原理是通过固定免疫反应物于电极表面来阻碍氧化还原活性底物（如二茂铁标记葡萄糖氧化酶）扩散到电极表面。类似于该原理，酶向媒介体修饰电极表面的扩散过程也可以被抑制。然而，这种方法对修饰层中的缺陷非常敏感，所以，需要在电极表面上构建高质量、高重现性的单层。另一种免分离免疫分析方法利用近似的作用，当抗体固定在媒介体修饰电极上时，酶标抗原只有在酶与媒介体直接接触时才可以被测定出，即所谓的"电线型"安培免疫传感器。该传感器通常是利用 HRP 作为标记酶，锇氧化还原聚合膜[66]或四硫富瓦烯[67]作为媒介体，或者利用 HRP 标记酶的催化电流测定[68]。当葡萄糖氧化酶标记抗原与电极表面固定的抗体结合，在葡萄糖存在条件下，可用于竞争或夹心免疫分析进行免疫传感。Risphon 等[69]提出另一种相似的原理，通过固定葡萄糖氧化酶在电极表面，用 HRP 作为标记酶。在这里，过氧化氢是在电极界面上而不是在均相溶液中产生的。该原理的优点在于，没有对过氧化氢的催化反应而不会破坏过氧化氢。通过安培免疫传感器测定 HRP 反应的产物获得。该方法与我们熟知的 BIAcore（表面自旋共振技术）类似，可以实时测定。然而，这种方法最主要的问题在于：传感器上固定的酶很难再生，这只能是一次性传感器。

安培免疫传感器由于其具有高选择性、高灵敏度，不仅广泛地用于医学临床诊断，而且在环境监测和食品工业等领域，成功测定了杀虫剂、农药、激素类物质等小分子物质（半抗原），获得了良好的可检测性。Growley 等[70]用印记电极制备安培免疫传感器用于粒细胞-巨噬细胞-群体激活因子（GM-CSE）的分析。Xu 等[71]将 POD 和抗-肾上腺素共同固定在一个覆盖在氧电极的亲和膜上，当待测抗原与膜上的抗体结合后，POD 对底物的电催化作用受到抑制。一次免疫分析后，用pH 1.5稀盐酸洗涤使传感器表面得以再生。Benkert 等[72]制备了一种安培分析的肌氨酸酐免疫传感器用于肌氨酸酐免疫分析，检测限达到 4.5 ng · ml^{-1}。Wilmer 等[73]用碱性磷酸酶标记单克隆抗体，用一个安培分析免疫传感器测定了水中 2,4-二氯苯氧基乙酸的含量，检测限为 0.1 μg · L^{-1}。

当今，恶性肿瘤发病率和死亡率的上升趋势正直接威胁着人类健康，利用肿瘤相关抗原作为肿瘤标志物（TM），通过免疫分析测定血清中 TM 的含量是肿瘤疾病诊断和病情监控的主要手段。鞠熀先等[74~79]近年来发展了一系列 CA125、

CA199、CEA、AFP 等肿瘤标志物的安培免疫传感器，利用硫堇单层修饰金电极建立了 CEA 的免疫分析方法[74]。他们采用 TiO_2 气相沉积溶胶-凝胶技术，将 CA199 固定于电极表面，利用图 8.11 所示原理，获得了 CA199 免疫传感器，成功用于胰腺癌患者血样 CA199 的测定[75]。

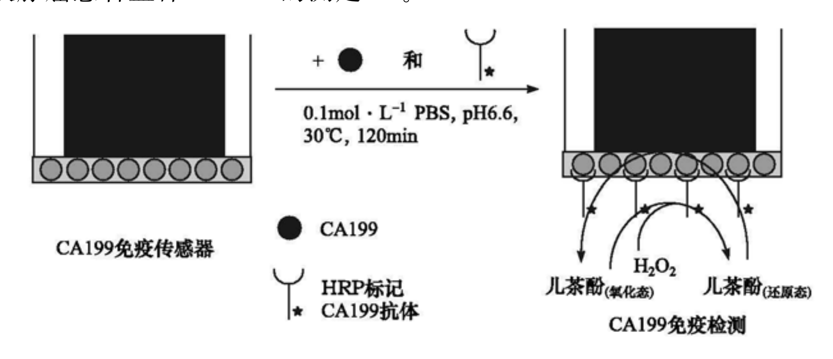


图 8.11　基于固定抗原、竞争免疫反应、以儿茶酚做电子媒介体进行电化学检测的 CA199 安培免疫传感器的示意图

将 CA125 固定在 TiO_2 溶胶-凝胶中，结合 HRP 标记的 CA125 抗体分子与传感器表面固定的 CA125 抗原分子发生免疫反应后标记 HRP 表现出的直接电子传递性质，发展了一种新颖的安培免疫传感器，如图 8.12 所示。该传感器具有较好的准确性、灵敏性和储存稳定性，结合竞争免疫分析原理，可以对血清中 CA125 含量进行简便、快速的测定而无需其他非免疫试剂或媒介体的加入，并避免了分离和洗涤步骤[76]。该方法也可用于其他安培免疫传感器的制备与免疫分析，如 hCG 的快速灵敏检测[77]。将媒介体固定化技术与酶联免疫分析原理、酶活性调节原理结合，基于无需媒介体加入和免分离无媒介体加入的免疫分析方法及免疫传感器也得到发展[78]。如将 HRP 标记的 CEA 抗体和硫堇固定在玻璃碳电极表面，通过免疫反应对固定化 HRP 的抑制制备了一种新型安培免疫传感器，用于 CEA 检测。

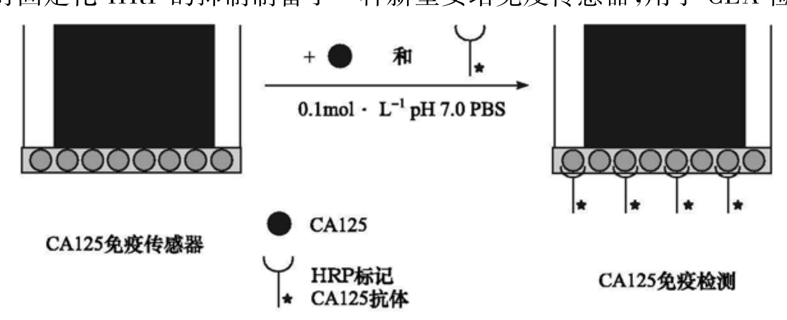


图 8.12　基于固定抗原、竞争免疫反应、辣根过氧化物酶标记 CA125 抗体的直接电化学行为的无试剂安培免疫传感器的检测原理

近年来，一次性使用和可更新的安培免疫传感器得到了迅速发展，丝网印刷技术以其墨层厚覆盖力强、适合各种类型的油墨、印刷方式灵活多样、不受承印物大小和性状的限制等特点已广泛被用于电化学传感器制备方面。所获得的一次性电极成本低，相互间重复性好，结果准确、可靠。将化学修饰、微加工和丝网印刷等技术与临床化学、肿瘤免疫学技术相结合，发展了小巧、成本低廉、制备简单、携带方便、性能稳定的一次性快速测定人血清 AFP 含量的免疫芯片[79]，适合于人们对免疫传感器件的迫切需求，因而具有强的市场竞争力。利用微制作技术，将两个不同抗体修饰的氧化铱电极集成，Wilson[80]提出了同时测定两种肿瘤标志物 AFP 和 CEA 的安培检测方法。

3）质量检测免疫传感器

质量变化可以通过压电晶体和声波技术测量出来。压电石英晶体传感器（又称压电晶体微天平）属于质量型传感器，表面质量的变化会引起其振荡频率变化。由于多数蛋白质表面具有赖氨酸及肽链 N 端 α 氨基，所以蛋白质能通过多种不同的方位结合到晶体表面，然后再进一步通过各种不同的侧面与溶液中的其他蛋白质或小分子反应。压电免疫传感器是将抗原或抗体固定在石英晶体表面（通常是镀金表面），免疫反应抗原（或抗体）与待测物中抗体（或抗原）发生特异性结合，可引起质量的变化，从而引起晶体振荡频率的变化，通过信号监测器直接读出来，既准确又方便。1972 年，Shons 等首次报道了压电现象并将其成功地用于免疫测试[81]，随后又有人报道了人体铁蛋白以及乳腺癌等肿瘤相关抗原检测的压电免疫传感器[82,83]。

4）热量检测免疫传感器

该类传感器是将抗原或抗体固定在包埋了热敏换能器（热敏电阻）的柱上，样品中的抗体或抗原与之发生反应后引起酶促反应，可产生 20～100 $kJ \cdot mol^{-1}$ 的热量，然后通过热敏电阻等元件检测出来。此法目前已经成功地用于白蛋白和庆大霉素以及人胰岛素的测定[84,85]。Urban[86]用小型薄膜热敏电阻固定抗体来检测抗原，制成了微型热量检测免疫传感器，预示着未来有可能生产出大小适宜且简单的装置。

5）光学免疫传感器

光学换能器可用来响应紫外线或可视射线，也可用来响应生物或化学发光产物，还能适用于含光纤的装置。用于临床检测的光学免疫传感器有荧光免疫传感器和化学发光免疫传感器等。化学发光免疫传感器是将化学发光试剂，酶（催化剂）或者荧光物质标记到抗原（抗体）上，通过特异性免疫反应与抗体（抗原）结合，

用化学发光反应测定标记物的化学发光强度,以确定被标记的抗原(抗体)的量[87]。Sasamoto 小组报道了以微型管作为反应器的化学发光酶免疫分析方法,并测定了 hCG 的含量[88]。Xue 等[89]报道了用电化学发光免疫传感器进行均相免疫测定 AFP 的方法。上述反应均是在孔板或者微管中进行测定,操作麻烦、费时。后来 Mack 等采用 Liaison® 自动免疫分析仪,结合磁珠技术,测定了血清中 hCG,检测时间仅为 10min[90]。Ju 研究小组采用流动注射分析和化学发光免疫方法相结合的技术,在非竞争免疫分析模式下,基于将抗原固定于溴化氰活化的琼脂糖凝胶而制得免疫亲和柱,分离免疫反应混合物中结合的和未结合的辣根过氧化物酶标记抗体,成功地检测了人血清甲胎蛋白的含量。而通过检测被捕获滞留在柱内的未结合的酶标抗体这一操作更简便的方法,可快速检测人血清中癌胚抗原的含量。将 CA199 抗原固定于交联壳聚糖膜上,将其嵌入到流通池中构建新型化学发光免疫传感器,在非竞争酶免疫分析模式基础上检测血清中 CA199 的含量,具有成本低廉、操作简便、方法灵活和测定快速的优点[91～93]。Chou 小组[94]用表面等离子体共振光谱(SPR)测定肿瘤标志物铁蛋白,将胱胺-戊二醛自组装在金表面用以固定铁蛋白的单克隆抗体。共振角度的移动与铁蛋白浓度的对数在 0.2～200 $ng \cdot ml^{-1}$ 呈良好的线性关系。这种方法与其他免疫传感器技术相比,有抗体固定方法简单、样品用量少、灵敏度高、可重复使用、不需标记物和预处理等优点。

6) 免疫传感器的发展

集生物学、物理学、化学及医学为一体的免疫传感技术,由于基于抗原与抗体间强的特异性结合,具有高的准确性和选择性,检测范围宽,所以不仅能弥补目前常规免疫检测方法不能进行定量测定的缺点,还能实时监测抗原抗体反应,不需分离步骤,即在抗原抗体反应同时就可连续地记录反应信号,有利于抗原抗体反应的动力学分析。它正朝着如下方向发展:①标记物的种类层出不穷,从酶和一般电活性分子发展成胶乳颗粒、胶体金、磁性颗粒和金属离子等;②向微型化、商品化方向发展,廉价的一次性传感器具有很广阔的市场前景;③向阵列化方向发展,以获得多组分分析物的联合测定;④与计算机等联用,向智能型、操作自动化方向发展;⑤应用范围日渐扩大,已深入到环境监测、食品卫生等工业和临床诊断等领域,以后者尤为突出;⑥继续提高其灵敏度、稳定性和再生性,使其更简便、快速和准确。

随着分子生物学、材料学、微电子技术和光纤化学等高科技的迅速发展,免疫传感器会逐步由小规模制作转变为大规模批量生产,并在大气监测、地质勘探、通讯、军事、交通管理和汽车工业等方面起着日益广泛的作用。总之,其发展潜力巨大,不但将推动传统免疫测试法发展,而且会影响临床和环境监测等领域中的实用性研究。

8.4.2　生物传感器在发酵与食品工业中的应用

1. 氨基酸类

氨基酸生产在发酵工业中占有重要地位，主要用于食品、保健品和医药，世界年销售额达数十亿美元。氨基酸测定常采用瓦勃呼吸法、平板生长速率法、层析法、酶法等。这些方法或操作烦琐、耗时较长，或精密度较差，并且都不能满足在线(on-line)分析的需要。目前至少有8种氨基酸能用酶电极来测定。

L-氨基酸能被L-氨基酸氧化酶(L-AAO)氧化，生成氨和过氧化氢，所以测定氧、氨或过氧化氢都能定量测定氨基酸。曾经报道可用L-AAO电极测定L-苯丙氨酸和L-谷氨酸，但L-AAO能作用于多种氨基酸(AA)，因此选择性不好。已有许多用电流型酶电极测定氨基酸的报道，但真正有实用价值的是谷氨酸测定和精氨酸测定。

将L-赖氨酸氧化酶固定在明胶基质中与氧电极结合，采用可减少氧干扰的载流缓冲液，线性范围为0.2～3 $mmol \cdot L^{-1}$，用动态测定法使酶失活减低到最低程度，每张酶膜能测定3000次[95]。该酶电极已经商品化。

利用谷氨酸脱羧酶对谷氨酸脱羧，用CO_2电极检测产生的CO_2能定量谷氨酸。用BSA-戊二醛法固定脱羧酶，酶活可维持3～5个月。采用这种方法，有时需要预先将试液中的CO_2用化学法除去，以使本底电流尽可能减小。L-谷氨酸氧化酶(EC 1.4.3.11)能氧化谷氨酸生成α-酮戊二酸，于是便有了电流型谷氨酸氧化酶电极[96]，该酶电极与谷氨酸脱羧酶法同时测酱油中的谷氨酸浓度，两种方法相关系数为0.978。台湾学者Chen等[97]将L-谷氨氧化酶用1,12-二氨十二烷为载体、戊二醛为胶联剂共价固定在三乙酸纤维素膜上，酶膜与氧电极组成测L-谷氨酸酶电极，响应时间少于3 min，线性范围1.2～8.5 μmol，在经历3个星期400次测定后响应活性保留95%。

2. 酒精测定

发酵液的酒精含量常用比重计法测定，操作简单但很粗糙；气相色谱法可以精确分析各种醇浓度，但显然成本高，技术复杂。醇脱氢酶(ADH)和醇氧化酶(EC 1.1.3.13)能分别催化醇进行下述反应：

$$R—CH_2OH + O_2 \xrightarrow{ADH} NADH + R—CH \tag{8.11}$$

$$R—CH_2OH + O_2 \xrightarrow{\text{醇氧化酶}} R—COOH \tag{8.12}$$

由于ADH催化的反应需要辅酶参加，因而增加了酶电极研究的困难，曾经报道的ADH电极最终未能被应用。Shigeyuki等[98]将NAD^+分子与酶共固定在平面金电极表面，极化电压为0.75 V，反应生成的NADH在金电极被氧化形成氧化

电流，在20 $mmol \cdot L^{-1}$ TAPS缓冲液中，2 min内完成响应。BSA膜显然能阻止NAD^{+}的流失，10次测定后，酶电极活力无明显损失。

相比之下，用醇氧化酶与氧电极做成的酶电极性能要优越得多，Guilbault等[99]首先用这种电极测定乙醇，与气相色谱法仅有2.5%的差异。YSI 27型工业分析仪能用来分析饮料中醇的浓度，醇氧化酶膜夹在聚碳酸膜和乙酸纤维素膜之间，酶活半衰期为7天，线性范围在94 $mmol \cdot L^{-1}$以内，误差小于2%。甲醇对测定有干扰，但饮料中一般不含甲醇。

3. 维生素C与淀粉测定

维生素C氧化酶能氧化维生素C生成脱氢维生素C。用胶原固定维生素氧化酶与氧电极组成酶电极，用于测定果实中的维生素C，响应时间是1 min，测定线性范围为$5\times10^{-5}\sim5\times10^{-4}$ $mol \cdot L^{-1}$，可稳定3个星期[100]。

淀粉是发酵最常用的原料，常规测定法需先将淀粉酶解或酸解成葡萄糖，再做定糖实验，过程冗长麻烦。利用YSI 27型酶电极仪的GOD膜测定淀粉，有两种方法，即内部水解法和外部水解法。内部水解法需定量向测定池中加入糖化酶，在酶电极输出电流稳定时加入淀粉样品，60 s后仪器显示淀粉水解成葡萄糖的稳定读数。外部水解法则需加入糖化酶和α-淀粉酶，测定葡萄糖浓度以推算淀粉含量。

这种通过定糖来测定淀粉含量的方法已广泛用于各种淀粉质原料和食品。Renneberg等[101]发展了一种更为巧妙且经济的方法，即将GOD和糖化酶共固定化，与过氧化氢电极组成测淀粉酶电极。样品中的淀粉经α-淀粉酶水解成低聚糖，低聚糖扩散进入膜被糖化酶（GA）水解继而被GOD氧化产生过氧化氢，使电极响应。如果样品中含有葡萄糖，会干扰响应，此时可通过增加一层GOD与过氧化氢酶共固化的酶膜，使葡萄糖在进入GA-GOD酶膜以前就被除去。这种电极称为抗干扰型酶电极，线性工作范围约为0.3%，响应时间0.5～1 min。

4. 过氧化氢测定

过氧化氢有很强的漂白和杀菌能力，在食品工业、印染纺织工业等部门被广泛应用。将过氧化氢酶固定在氧电极表面，测定氧的释放量便能定量过氧化氢[102]。在反应过程中，随着过氧化氢的分解和氧的释放，酶电极输出电流增加，在20℃条件下，采用稳态测定法测定。实验中发现，随着过氧化氢浓度的增加，响应时间也延长。如当过氧化氢浓度为0.5 $mmol \cdot L^{-1}$时，响应时间为1.5 min；浓度为1.0 $mmol \cdot L^{-1}$时，响应需2 min。由于在pH 6.2时，电流输出与过氧化氢在1.5 $mmol \cdot L^{-1}$范围内呈线性关系，于是将电极插入反应液后3 min时的读数作为响应值。

5. 果糖测定

果糖广泛存在于各种食品中,是主要的甜味剂。Ikede 等[103]提出一种基于直接生物电子催化的电流型果糖传感器。D-果糖脱氧酶(FDH)是一种膜结合的氧化还原酶,将 FDH 不可逆地吸附到碳糊电极表面并覆盖以透析膜,使碳糊电极电位高于 Ag/AgCl 电极。测量缓冲液含 0.1% Triton X-100,pH 4.5。酶电极对果糖产生响应电流,达到稳态需 100 s。线性响应随工作电压的增高而增加,当工作电极与 Ag/AgCl 电极电位差从 0 变化到 0.5 V 时,果糖浓度在 0.1～30 $mmol \cdot dl^{-1}$ 内与输出电流线性相关。在 5～25 ℃,电极响应的温度系数为 2.3%$℃^{-1}$。在 25℃连续测量 2 h,电流输出无明显变化。酶电极于 5 ℃在缓冲液中存放时活性会逐渐下降,工作寿命为 10 天。氧和各种低分子糖对测定无干扰,但 L-抗坏血酸能在电极上直接被氧化,从而造成正干扰,在酶电极上同时固定抗坏血酸氧化酶(AOD)能消除这种干扰。含固定化果糖脱氢酶和抗坏血酸氧化酶的酶电极已用于果汁中的果糖浓度测定。

8.4.3　胆碱生物传感器有机磷农药测定

有机磷化合物在农业和其他领域中应用非常广泛。这类化合物毒性很强,可不可逆地抑制乙酰胆碱酯酶的活性,从而影响中枢神经系统的功能,常常引起呼吸系统瘫痪,严重可导致死亡。近年来,基于酶促反应检测机制的电化学生物传感器由于在检测毒性化合物方面具有特殊的优点,已经成为一种较好的替代检测方法,一系列酶如有机磷水解酶、碱性磷酸酶、抗坏血酸氧化酶、酪氨酸酶和酸式磷酸酶已经用来制备杀虫剂生物传感器。Marty 等[104]设计了一种基于乙酰胆碱水解的电流型酶电极,基本原理如下:

$$\text{乙酰胆碱} + H_2O \xrightarrow{\text{乙酰胆碱酯酶}} \text{胆碱} + \text{乙酸} \quad (8.13)$$

$$\text{胆碱} + O_2 \xrightarrow{\text{胆碱氧化酶}} \text{甜菜碱} + H_2O_2 \quad (8.14)$$

根据过氧化氢在电极上的氧化电流可测定乙酰胆碱的活性,该活性随着有机磷化合物浓度的增加而降低。固定化乙酰胆碱酯酶(AChE)活性抑制取决于农药浓度和作用时间,抑制物浓度可测,线性范围为 10^{-8}～10^{-5} $mol \cdot L^{-1}$。

这种方法测氨基甲酸农药的灵敏度较高,对有机磷农药灵敏度较低。鉴于低浓度农药能导致明显的电流降,用较低的酶活力便可检出微量农药,该方法不仅成本低,且易操作,但灵敏度则需进一步提高。

将电化学生物传感器和流动注射分析方法结合有利于控制分析试剂的添加过程和酶活性的在线检测,提高样品分析量以及提高分析过程自动化和降低检测限,提高分析响应度并且有利于固定酶的重复使用。鞠熀先等[105]在预处理的玻碳电

极表面形成壳聚糖-多壁纳米碳管复合材料膜，构造了生物兼容性好的性能稳定的仿生界面，将乙酰胆碱酯酶固定在电极表面。利用该传感器，基于杀虫剂对胆碱酯酶活性的抑制作用，通过比较加入底物氯化乙酰硫代胆碱（ATCl）后固定的胆碱酯酶对底物的催化反应产生的电化学活性物质胆碱的安培响应的相对衰减程度，测定有机磷杀虫剂含量，建立了一种有机磷杀虫剂快速灵敏稳定的检测技术。多壁纳米碳管的存在可以大大降低工作电压，放大检测信号。在此复合膜上，固定的 AChE 可稳定地保持其天然状态。

该方法将适量 25% 的戊二醛与 0.5% 的壳聚糖溶液混合搅拌 10 min，再向 1.3 mg多壁纳米碳管中加入 1.0 ml 的混合溶液，超声至溶液混合均匀，取 3.0 μl 混合溶液置于预处理好的玻碳电极，于 25℃下反应 4h，在电极表面得到交联壳聚糖-多壁纳米碳管复合膜。取 2.0 μl 乙酰胆碱酯酶（10 mIU）溶液滴涂于复合膜修饰电极表面，25℃温育 30min，通过与壳聚糖键合的戊二醛的自由醛基将乙酰胆碱酯酶与复合膜结合，实现乙酰胆碱酯酶的固定。以含 0.1 mol · L^{-1} KCl 的 0.1 mol · L^{-1}、pH 7.4 的 PBS 溶液作为支持电解质溶液，在流动池中施加相对于 Ag/AgCl 为＋600 mV 的电位阶跃进行电化学测定。当电流信号的基线平稳后，体系中加入 500 μmol · L^{-1} 底物 ATCl，记录传感器的电化学响应信号 I_0。当电极用载液以 1.0 ml · min^{-1} 流速清洗 2min 后，注入 0.5 ml 治螟磷溶液，在分析池中停留 14min，然后用载液以 1.0 ml · min^{-1} 流速清洗 2min，再加入 500 μmol · L^{-1} ATCl 底物所得电流信号记为 I_t。抑制分数（$I\%$）按式（8.15）计算，由抑制分数（$I\%$）对数与治螟磷浓度间的线性关系进行治螟磷浓度的定量测定。测定过程如图 8.13 所示。

$$I\% = \frac{I_0 - I_t}{I_0} \times 100 \tag{8.15}$$

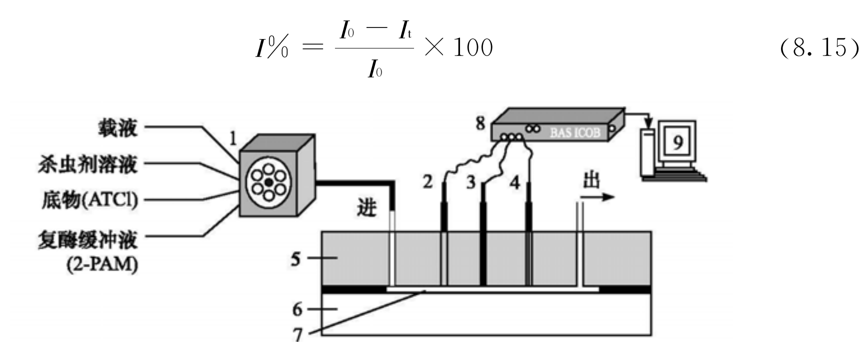


图 8.13　有机磷杀虫剂的流动注射电化学测定示意图

1. 蠕动泵；2. 辅助电极；3. 工作电极；4. 参比电极；5，6. 流动池的顶层和底层；7. 流动管道；8. 电化学测量仪器；9. 微型计算机

该技术检测治螟磷的浓度范围为 1.5～80 nmol · L^{-1}，检测限在 $I\%$＝10%时为 1.0 nmol · L^{-1}。采用解磷定作为固定乙酰胆碱酯酶的再生剂，可以除去乙酰

胆碱酯酶活性中心丝氨酸上结合的有机磷基团。当酶电极与有机磷杀虫剂接触后，用载液以 1.0 ml · min^{-1} 流速清洗 2min 后，酶电极用 5.0mmol · L^{-1} 解磷定再生 15min，再用载液以 1.0 ml · min^{-1} 流速清洗 2min，酶的再生效率可达 95%以上。

8.5　DNA 生物传感器

核酸在生命过程中扮演着重要角色，近几十年来一直为各种技术手段广泛研究。自从 Paleček 等发现核酸的电化学活性[106]以来，DNA 电化学行为和识别的研究已引起足够重视，导致了一系列用于快速、廉价检验 DNA 浓度和结构变化的伏安方法。近来，基于凝胶电泳或膜印记特大尺度上的基因试验的传统方法已经不能够满足 DNA 序列检测的需要。生物传感器提供了一个值得信赖的快速、廉价的核酸检测方法。基于核酸杂交过程的 DNA 传感器促进了基因疾病的诊断、传染媒介的检测、基因表达差异的测量，以及法庭科学、药物筛选与环境监测等的发展。DNA 电化学传感器结合了电化学方法的分析能力和核酸识别过程的特异性，在检测 DNA 杂交方面受到了广泛关注。这种技术代表了一个有着众多优点的新研究领域，如廉价、易于设计、小尺度和低能耗。

8.5.1　DNA 电化学性质

DNA 的电化学行为研究源自 20 世纪 50 年代末 Paleček 的发现，该课题组系

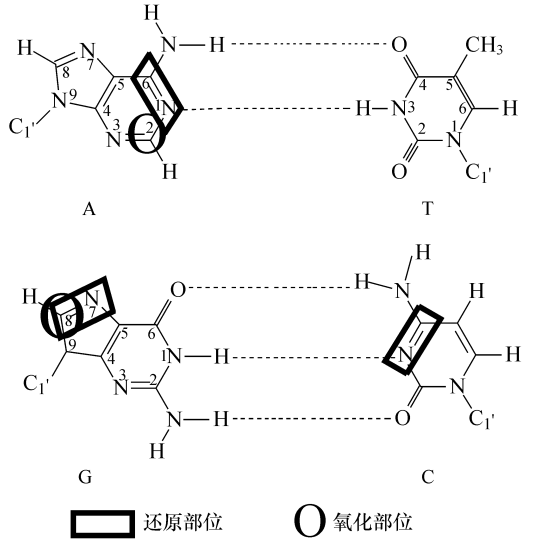


图 8.14　DNA 中碱基的氧化还原部位

统地研究了 DNA 在汞以及汞齐电极上的电化学行为。汞电极显示出对于 DNA 结构变化不同寻常的灵敏度和 DNA 的预熔化与双螺旋的多晶型现象的早期证据。在 DNA 的组分中，只有碱基能在汞电极和碳电极上发生氧化还原反应（图 8.14），核苷以及核苷酸中的核糖和脱氧核糖键与磷酸基团一样是非电活性的。鸟嘌呤和腺嘌呤可以在碳电极上氧化（在较正的电位下），鸟嘌呤、胞嘧啶和腺嘌呤的还原在很负的电位下发生，所以只能在汞电极上得到还原峰。在中性 pH 条件下，ssDNA 和 RNA 中的胞嘧啶和腺嘌呤可以在汞电极上被还原，产生的还原峰接近 −1.4 V。胸腺嘧啶和尿嘧啶仅仅能在非水介质中并且在很负的电位下发生还原。由于鸟嘌呤的还原在比较负的电位下进行，在循环扫描时，鸟嘌呤的还原产物在 −0.3 V 左右产生一个氧化峰。

8.5.2　DNA 浓度的电化学检测

在汞电极上进行 DNA 直接电化学的研究已使人们对 DNA 双螺旋结构有了更为深入的理解。此领域的主要目的集中在 DNA 在汞电极上的还原以及汞电极与天然 DNA 或变性 DNA 的相互作用的研究上。当 DNA 与电极作用时，通常强烈地吸附在电极上。吸附的 DNA 通过电荷转移反应产生信号，这些信号能够提供有关核酸的类型和浓度、结构变化以及与其他化合物作用的一些信息。而且，将 DNA 固定于电极表面是构建快速响应 DNA 检测器的基础。

示差脉冲极谱法作为最灵敏的电化学方法之一，可以灵敏地反映出由于物理的或化学的刺激导致 DNA 双螺旋小的损伤。然而，此方法需要数十微克单链 DNA 和数百微克双链 DNA，对于分析质粒或病毒 DNA、寡聚核苷酸和其他核酸样品来说灵敏度过低。

利用溶出伏安法检测腺嘌呤和胞嘧啶的还原信号，可以将灵敏度提高几个数量级。Jelen 等[107]用悬汞电极（HMDE）的方波极谱法（SWV）研究了单链 DNA 的电化学，发展了一种 DNA 的吸附溶出伏安检测方法，将检出限降至数十纳克每毫升（$ng \cdot ml^{-1}$）。单链 DNA 显示出一个由腺嘌呤还原产物产生的阴极峰和一个由鸟嘌呤氧化产物产生的阳极峰。Wang 等[108]报道了在预处理碳糊电极上单链 DNA 的循环伏安曲线，在 +1.05 V 处显示出鸟嘌呤残基的阳极峰，利用吸附溶出电位法建立了测定纳克级单链 DNA 的方法。

陈洪渊等[109]用循环伏安法研究了 DNA 在预电化学氧化处理的玻碳电极上的氧化。预处理过程是在 pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液（PBS）中，搅拌时在 +1.75 V（相对于饱和甘汞参比电极）电位下电化学氧化玻碳电极 300s，随后在 +0.3～+1.25 V电位范围内进行循环扫描直至得到稳定的电流-电位曲线。预处理过的电极使检测热变性和酸变性 DNA 的灵敏度大大提高（图 8.15）。在预处理过的玻碳电极上，热变性和酸变性 DNA 在第一个阳极扫描曲线上于 +0.80 V 和 +1.11 V

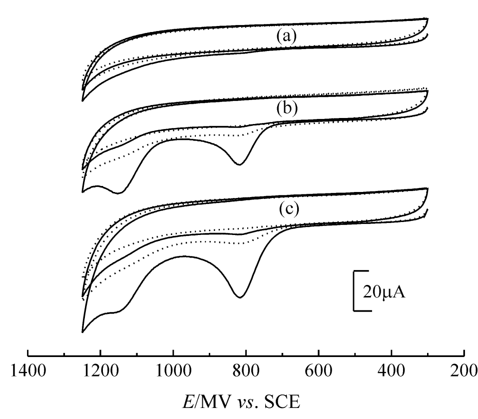


图 8.15　未处理的 GCE(虚线)和预处理的 GCE(实线)在含 1.0mg · ml^{-1} 天然 DNA [(a)], 1.0mg · ml^{-1} 热变性 DNA [(b)]和 0.30mg · ml^{-1} 酸变性 DNA [(c)]的 0.1mol · L^{-1} pH 5.0 PBS 溶液中的循环伏安图
扫速 100mV · s^{-1}

处分别给出了两个明显的氧化峰,在未处理过的玻碳电极上则不明显。+0.80 V 和+1.11 V 处的两个氧化峰分别对应于变性了的 DNA 鸟嘌呤和腺嘌呤残基的电化学氧化,天然 DNA 则几乎没有任何响应。因此预处理的玻碳电极对于 DNA 双螺旋的变化有很高的灵敏度。变性 DNA 在预处理的玻碳电极上的氧化是一个完全不可逆的过程。基于这两个氧化峰,提出了一个简便的测定变性 DNA 的方法。当在+0.3 V 的电位下富集 150s 后,热变性 DNA 和酸变性 DNA 的检出限分别为 2.0μg · ml^{-1} 和 0.10 μg · ml^{-1}。

测量 G 和 A 各自的浓度或者两者的比值与测量 DNA 浓度本身同样重要。通过在预处理过的电极表面在合适电位(+0.3 V)或开路富集变性 DNA,陈洪渊等[110]提出了一个简便的 DNA 中的 G 和 A 基团含量的同时测定方法。G 和 A 测定的检出下限分别为 4.5 ng · ml^{-1} 和4.0 ng · ml^{-1}。此方法可以利用先前得到的同时测定 G 和 A 的标准曲线或是标准加入法来估计 DNA 中 G 和 A 的含量。在 pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液中玻碳电极在+1.75 V (*vs.* SCE)电位下电化学氧化 10min,随后在 0.3～1.3 V 循环扫描 20 圈,结果对单链 DNA 检测的灵敏度提高 100 倍[111]。在 pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液中开路富集 8min 后,热变性 DNA 的检出限大概为 0.2 μg · ml^{-1}。

8.5.3　DNA 电化学传感器

1. 基本原理

DNA 杂交生物传感器结合了生物识别过程的特异性以及物化传感器件的高灵敏性,为 DNA 分析提供了一种很有前景的方法。与光学及压电传感器相比,电化学传感器因具有高灵敏性、便携性及与微制造技术相兼容等特性,获得了广泛关注。与其他 DNA 技术(包括杂交、扩增和重组)一样,Watson-Crick 的碱基互补配对规则是 DNA 传感器的基本原理。单链 DNA(ssDNA)和寡聚核苷酸是 DNA 传感器中常用的探针。信使 RNA 通常要逆转录为更加稳定的互补 DNA(cDNA)形式。肽氨酸(PNA)识别层也可以应用于制备电化学生物传感器。PNA 中碱基之间的距离与 DNA 中碱基之间的距离非常接近。DNA 电化学生物传感器通过将

单链 DNA、寡聚核苷酸或者 PNA 探针固定在电极表面,利用与样品溶液中的互补 DNA 链或者寡聚核苷酸碱基配对来进行识别。通过检测电活性指示剂的电流变化,或者因双螺旋结构形成而产生的电、界面性质的变化可用来监测杂交事件的发生。

2. DNA 探针的固定

对于成功的 DNA 传感器首先应考虑探针 DNA 的固定。探针 DNA 在表面的分布、密度以及取向对传感器的性能有很大影响。常用探针固定方法包括吸附法、包埋法、生物素-亲和素法以及共价键合法等。

1) 吸附法固定 DNA 探针

吸附法是将 DNA 固定在电极表面上的一种最简单的方法,不需要试剂,也不需对核酸进行专门修饰。用于该法固定的电极材料有:硝化纤维、尼龙膜、聚苯乙烯、金属氧化物表面(钯或铝的氧化物)或碳/碳糊传感器。吸附法的主要缺点是:在杂交过程中核酸可能从电极表面脱附;DNA 分子通过多位点吸附在电极表面,导致杂交效率较低。

通过施加电位将 ssDNA 吸附固定在碳糊电极或丝网印刷碳带电极上的报道较多[112~114]。新抛光的碳糊电极在+1.75V 或+1.8 V(Ag/AgCl 参比电极)下处理 1min 后,在+0.5 V 电位下,于搅拌的溶液中电化学吸附单链 DNA,吸附时间依据 DNA 的浓度而定。所加电位通过带正电荷的电极表面与带负电荷的亲水糖-磷酸骨架之间的静电吸附增加了固定 DNA 的稳定性,使碱基朝向溶液中,可以与靶序列杂交[114]。这一方法快速而且简单,但在加热或尿素变性的条件下,电极难以重复使用。

Wang 等[115]还利用电化学吸附的方式将 PNA 固定在碳糊电极上,碳糊电极在+1.7 V 活化后,在-0.1 V 电位下吸附 2min 可以将 PNA 固定在电极表面。将双链 DNA 溶液滴在玻碳电极的表面让其自然蒸发至干,通过物理吸附可将双链 DNA 固定于碳电极表面[116]。

2) 包埋法

DNA 通过探针的磷酸骨架与硅溶胶二氧化钛珠上的二氧化硅单层结合,然后将该珠混合分散在碳粉和石蜡油中做成碳糊电极。该电极的表面可以不断更新,因此可以保证电极表面上有新的杂交探针,电极可以重复使用[61]。

3) 抗生物素蛋白-生物素的配位作用固定 DNA

生物素与抗生物素或链抗生物素蛋白具有很高的亲和力($K_a=1.0\times10^{15}$)。

将碳电极在+1.6 V电位下处理1min后，插入含有抗生物素蛋白的溶液中吸附抗生物素蛋白于电极表面，再将合成的生物素标记的低聚核苷酸探针通过抗生物素蛋白与生物素的配位作用固定在电极表面[117]。还可以利用生物素/抗生物素蛋白/生物素这种三明治的结构固定DNA，先将生物素固定于电极表面，结合抗生物素蛋白后，抗生物素蛋白再与生物素标记的低聚核苷酸结合进行固定[118]。

4）共价键合固定DNA

人们总是希望通过一种连接键将DNA的一端固定在电极的表面，DNA探针可以充分利用其结构变型性，通过调整其构象增加杂交效率。

在玻碳电极上的共价固定是由Millan等提出的[119]，将玻碳电极在酸性溶液中电化学氧化后，将适量水溶性碳二亚胺溶液（EDC）和*N*-羟基磺酸基琥珀酰亚胺（NHS）溶液滴在电极表面蒸发至干，再将少量单链DNA溶液滴在电极表面蒸发至干，通过脱氧鸟核苷酸（dG）残基将单链DNA固定在电极上。只有单链DNA才能在电极表面固定。

人工合成的5′端基含有巯基的单链DNA可通过巯基固定在金电极上[120]。Sun等[121]通过水溶性碳二亚胺将合成的单链DNA片段固定于氨基乙硫醇自组装金电极上，这种键合是单链DNA的5′端基磷酸基团与氨基结合形成磷酸亚胺键完成的。

对于铂电极，先使其在联二硫酸钠溶液中还原，再在$K_2Cr_2O_7$溶液和HNO_3溶液中氧化，然后立即将电极放入3-氨基-丙基三乙氧基硅烷溶液中，乙氧基的一部分作为离去基团与铂电极表面的氧化物键合，同时也存在着硅烷分子内部的交叉连接。这一共价键合过程可以造成DNA非常强的非特异性键合，因为在单链DNA中带负电的磷酸基和带正电的氨丙基硅烷之间存在着离子反应。因此又提出了利用巯基-硅烷的新的表面衍生化技术，在电极涂上巯基硅烷后与碘代乙酸一起孵育（活化表面产生羧基功能团），之后电极再与水溶性碳二亚胺一起温育，DNA碱基上的氨基与电极上活化的羧基反应[122]。另一种方法是直接将吡咯和单链低聚核苷酸一起在铂电极上进行电化学共聚，最终的化合物是吡咯共价连接到单链DNA上的化合物[123]。

一般而言，共价键合的探针提供了更多结构上的柔韧性，而且尽可能地减少了非特异性吸附。为了获得更高的杂交效率，探针识别层可由末端巯基修饰的DNA和巯基己醇形成的混合自组装构成。巯基己醇分子单层可防止DNA骨架和电极表面的接触，从而使探针DNA在表面呈直立状态，更利于杂交。

3. DNA杂交指示剂

由DNA杂交过程形成的双链DNA（dsDNA）通常可以选择适当的电化学杂

交指示剂来检测。电活性杂交指示剂可分为内部指示剂和外部指示剂两类。所谓内部电活性指示剂是指利用 DNA 分子中的碱基或其他修饰基团的电活性进行检测。众所周知,虽然 DNA 链的脱氧核糖和磷酸骨架是非电化学活性的,但是鸟嘌呤和腺嘌呤却可以在碳电极上发生氧化。Wang 等[124]用肌苷代替 DNA 探针中的鸟嘌呤来消除探针中鸟嘌呤的氧化峰,然后利用探针与靶序列杂交后鸟嘌呤氧化峰的出现进行检测。方禹之等[125]在靶序列 DNA 的末端衍生二茂铁基团,通过检测二茂铁电化学信号的有无来表征杂交事件的发生与否。Lumley-Woodear 等[126]则在待测 DNA 链端衍生辣根过氧化酶,一旦进行杂交反应,修饰电极便能催化过氧化氢电化学还原。另一种内部指示剂法是“三明治”法,它先将待测的长链 DNA 与固定化的短链探针杂交,然后再让长链上的未杂交部分与修饰有电活性标记物的短链 DNA 杂交,从而进行电化学检测[127]。内部指示剂在灵敏度、选择性上有一定的优势,但其探针合成步骤较烦琐,因而目前在电化学 DNA 传感器领域占主导地位的仍然是外部指示剂法。

外部指示剂或称杂交指示剂是一类具有电化学活性的物质,它能选择性的区分单链 DNA 和双链 DNA。当它与 DNA 结合,发生可逆的氧化还原反应时,可与 DNA 发生电子交换,而 DNA 通过远程电子传递而使指示剂与电极发生电子交换完成电化学反应过程。许多种类的物质包括药物分子、过渡金属的配合物(主要有 Pt、Ru、Co、Fe 和 Os 等金属的配合物)、生物分子(如细胞色素 c 和某些酶)、有机化合物(如染料和荧光试剂)、C_{60} 和 Doyle 催化剂可作为电活性指示剂用来监测 DNA 杂交事件或者 DNA 损伤。两种特别的杂交指示剂,即线形嵌入剂和双嵌入剂,比通常的嵌入剂分子能够更紧密地结合到双链 DNA 上,而对单链 DNA 的亲和力则可以忽略,因此被广泛地用来更好地区分单、双链 DNA。例如二茂铁基萘二亚酰胺[128]有 3 个方面的优点:与单链 DNA 相比,可更强烈地键合到双链 DNA 上;对 DNA 序列无差异性;与 DNA-DNA 双链相比,可更强烈地键合到 DNA-RNA 杂交双链上。这些性质使 DNA 检测限低至 10 zmol,而且适合于电化学检测 mRNA 的表达。最近,电化学酶联免疫测定也用于 DNA 杂交传感器的设计。

指示剂分子与 DNA 之间存在 3 种作用方式:沿着 DNA 双链的静电作用,通常是非特异性的;沟槽作用,即小分子直接与大小沟槽中或大沟槽碱基对的边缘作用;平面芳香环嵌入到碱基对当中的嵌入作用。静电作用和沟槽作用一般不改变 DNA 的构型,而嵌入作用则改变糖-磷酸骨架的扭转角,将临近的碱基对分开以便嵌入剂的插入。与单链探针 DNA 相比,沟槽和嵌入作用对杂交后生成的双链 DNA 拥有更高的亲和力。指示剂分子与单、双链之间亲和力的差异导致了指示剂与表面复式结构结合以后诸如安培电流、电位、法拉弟阻抗或者电容等电化学响应发生变化。

双链 DNA 与静电结合剂,如 $Os(bpy)_3^{2+}$ 作用时,阴极峰和阳极峰都朝更负的方向移动;嵌入剂如 $Co(phen)_3^{3+}$ 却使峰电位移向更正的数值,显示了较强的疏水作用。一些金属螯合物具有产生电致化学发光的能力,已用于研制 DNA 杂交检测器[129]。

四氧化锇的配合物大概是第一个与 DNA 共价键合的电活性标记物。其中一些化合物,如四氧化锇 2,2-吡啶优先与 ssDNA 中的胸腺嘧啶残基结合,而另外一些,如四氧化锇啡咯啉,与双链和单链 DNA 都结合。DNA 与这些化合物的加合物在碳电极和汞电极上于 −0.2 V 和 −0.7 V 产生可逆信号,在汞电极上于 −1.2 V 产生一很大的催化信号。催化信号的灵敏度比未修饰单链 DNA 的灵敏度高两个数量级。后来,其他电活性标记物与 DNA 的结合主要用于生物传感器方面。

Pyle 等[130]曾对指示剂与 DNA 结合的不同影响因素进行过研究,如几何形状、分子大小、疏水性和形成氢键的能力等,他们认为分子几何形状的影响最为重要。

选择合适的分子界面来检测 DNA 杂交的电化学传导是绝大多数 DNA 传感器设计上的一个关键步骤。研究 DNA 和其他分子之间的相互作用即有可能使用这些分子作为杂交指示剂。近来,Paleček 等扩展了杂交界面和检测电极的选择范围[131]。尽管 DNA 识别的无标志物策略和 DNA 检测的电子传递中介即将成为有前途的方式,但是使用简单嵌入剂、螺纹嵌入剂或者双嵌入剂作为氧化-还原指示剂的 DNA 杂交传感器的研究依然是一个重要研究领域。

4. 电化学 DNA 传感器

DNA 电化学传感器是由一个固定了 DNA 片段(探针)的电极和检测用的电活性杂交指示剂构成。DNA 探针一般是一个单链 DNA 片段,也可以是一条整链,长度在十几个到上千个核苷酸不等,与靶序列是互补的。通常多采用人工合成的寡聚脱氧核苷酸作为 DNA 探针,将这种探针分子(ssDNA)固定在电极表面构成 DNA 修饰电极。探针分子与其互补链杂交的高度选择性使 ssDNA 修饰电极具有极强的分子识别功能。在适当的条件下,电极表面的 DNA 探针分子能与靶序列选择性地杂交,在电极表面形成双链 DNA,从而导致电极表面结构的改变。这种杂交前后的结构差异,可通过一电活性杂交指示剂来识别,这样便达到了检测靶序列的目的。所以 DNA 探针在电极表面的固定和杂交指示剂的选择是构建 DNA 电化学传感器的关键。用于 DNA 传感器制备的基底电极、探针固定方法、杂交指示剂等列于表 8.5。

表 8.5　DNA 电化学传感器

电极材料				探针固定方法	杂交指示剂	用途
汞	金属	碳基材料	其他			
滴汞、悬汞、汞膜、汞齐	金、铂、银	碳糊、石墨、碳纤维、玻碳、丝网印刷、铅笔等	铟锡氧化物、纳米碳管/纳米金胶修饰等	吸附、共价键合、溶胶-凝胶包埋、自组装单层、亲和反应、免疫反应	金属化合物、染料和荧光试剂、生物分子(细胞色素 c、酶)、药物分子等	DNA 杂交传感器、DNA 损伤传感器、毒物监测传感器

DNA 电化学传感器主要是用于靶序列的杂交检测或靶序列分析。如图 8.16 所示[132]，亚甲蓝(MB)在固定有酵母单链 DNA 和双链 DNA 的电极上响应明显增加，在双链 DNA 电极上反应变成了一个扩散与表面联合控制的过程。MB 分子在单链 DNA、双链 DNA 修饰金电极的吸附常数分别为 $(3.3\pm0.3)\times10^{3}\ mol^{-1}\cdot L$ 和 $(6.6\pm0.4)\times10^{3}\ mol^{-1}\cdot L$。更大的吸附常数使响应增加。同样，耐尔蓝(NB)可与吸附在金电极上的小牛胸腺 ssDNA 和 dsDNA 分别发生静电作用和静电与嵌入两种方式同时作用而结合到电极上，使电流响应增加[133]，因而 NB 可作为 DNA 杂交的电活性指示剂。

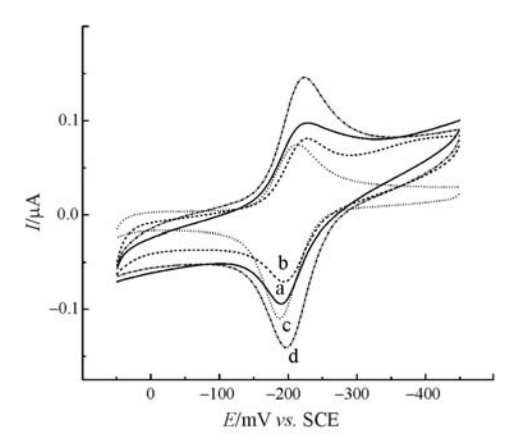


图 8.16　裸金(a，实线)，SAM/金(b，短划线)，ssDNA/金(c，点线)和 dsDNA/金(d，短划点线)电极在 50 $\mu mol\cdot L^{-1}$ MB+50 $mmol\cdot L^{-1}$ Tris (pH7.2)+20 $mmol\cdot L^{-1}$ NaCl 溶液中的循环伏安图

扫速：$100mV\cdot s^{-1}$

DNA 杂交检测的一个主要问题是在生理学水平上待测 DNA 的量通常处于飞摩尔(10^{-15})或渺摩尔(10^{-18})数量级上，远低于一般分析技术的检测限。有两个途径可以解决这个问题：放大目标或者放大信号。显然，仅仅放大信号达到在渺摩尔数量级上检测 DNA 的信号是非常困难的，因此，通过比如像聚合酶链反应这样的基于目标扩增的方法来放大样品是解决此问题的最佳选择。聚合酶链反应是扩增样品的一个众所周知的生物分子学技术，它可以将任何有特定序列的 DNA 得以极大地扩增，理论上 PCR 技术在重复一定次数的循环后可以将 DNA 的单个拷贝指数扩增至一定数量的 DNA，因此它与 DNA 电化学传感器相结合可以检测 10^{-15} 到 10^{-18} 摩尔数量级的 DNA 分子。

利用 PCR 这类放大目标的方法来放大样品可以解决电化学 DNA 杂交检测的灵敏度问题。在电化学检测器上收集到足够数量的 DNA 分子就可以产生足够

检测的电化学信号，通过计算，在电化学传感器上可检测到 $10^{-15} \sim 10^{-18}$ mol 或者更低数量级的 DNA 分子[133~135]。一般来讲，电化学富集核酸可以包括一个平行的 PCR 扩增和电化学检测步骤。样品准备、PCR 和检测模块可以整合成一个高效、易于使用的带有一支低值电极的装置[136]，这样可使电化学模块方法更适用于日常实验室诊断或者更进一步发展为实时在线诊断的工具。为了实现乙肝病毒 DNA 片段的高灵敏电化学检测，鞠熀先等[134]设计了一对引物，利用 PCR 方法扩增已知 181 个碱基序列的乙肝病毒 DNA 片段，通过共价键合方法将扩增产物固定在修饰金电极表面，研究了电活性指示剂 $FcPF_6$ 与固定化的乙肝病毒 DNA 片段间的相互作用，检测出 1 万个拷贝(即 1.7×10^{-20} mol)的初始模板 HBV DNA 分子，极大地提高了电化学分析的灵敏度。他们还在此基础上提出了一个检测杂交过程的杂交生物传感器，它只对特定的互补 DNA 有响应，具有高度的专一性。用 $[Os(bpy)_2Cl_2]^+$ 为电化学指示剂，结合 PCR 技术，分别用金电极和氧化处理的玻碳电极衍生固定 HBV ssDNA 探针，可以检测 5000 个拷贝即 8.3×10^{-21} mol 的初始模板 HBV DNA 分子[135,137]。

另一方面，结合了酶联免疫反应的电化学检测则是将小的电化学信号放大的技术[138,139]。Willner 等[140,141]使用了另外一种放大 DNA 传感的方法，即通过酶催化反应在电极表面沉积一层不溶物，然后通过法拉第阻抗进行测量。当然与 PCR 技术结合会更进一步提高这些方法的测定灵敏度。

近期，Wang 等[142]采用电化学溶出检测金胶标记物，发展了一种新的 DNA 序列杂交检测方法。使待测 DNA 和固定在磁珠上的寡核苷酸探针 DNA 杂交，然后将抗生物素蛋白覆盖的金胶结合到 DNA 上，进行磁珠收集，酸溶解金胶，电位溶出测量酸解的金胶标记物。进一步的信号放大可以通过催化银沉积在金胶上形成 Au/Ag 壳核结构获得[143]。使用一次性铅笔石墨电极上的金胶氧化信号，Ozsoz 等[144]发展了一种检测 PCR 扩增产物的方法。Wang 等[145]使用在金胶/抗生物素蛋白复合物上二茂铁基团的氧化，发展了一种三明治型的杂交检测。由于每个金胶纳米粒子可以吸附很多的二茂铁基团，而且多个金胶纳米粒子可以连接到单个抗生物素蛋白上，因而使每条双链 DNA 上的标记物量大大增加，使信号得到显著放大。

用量子点标记可实现多种 DNA 靶序列的同时检测[146]。该体系采用三明治型杂交方案，操作步骤包括引入探针 DNA 修饰磁珠、探针 DNA 与待测 DNA 序列杂交、待测 DNA 与量子点标记探针 DNA 的二次杂交、溶出伏安法检测相对应的金属，峰电位和峰电流大小反映出相应待测 DNA 的序列和量的多少。鞠熀先等[147]设计了一种复合型丝网印刷电极，在工作电极上修饰多壁碳纳米管，用循环伏安法研究了 ssDNA 鸟嘌呤残基直接电化学氧化，碳纳米管显示出优异的催化特性，可以灵敏地测定富集在修饰电极表面的 ssDNA。在富集 5min 后，利用鸟嘌呤残基直接电化学，ssDNA 的检出限为 $2.0\ \mu g \cdot ml^{-1}$，线性浓度范围为

17.0 μg · ml^{-1}～0.345 mg · ml^{-1}。同样,该电极上修饰的碳纳米管对 RNA 的腺嘌呤的氧化有催化作用,通过富集,测定 RNA 的线性范围为 8.2 μg · ml^{-1}～4.1 mg · ml^{-1},检出限为 8.2 μg · ml^{-1}。区别于其他检测 RNA 的方法,此体系测定步骤简便,测定结果直观。

5. 直接电化学 DNA 生物传感

直接电化学检测无需外部杂交指示剂或对待测物的标记,缩短了检测时间,越来越受到人们的关注。原则上,直接电化学检测源于杂交后所引起的两个效应:目标序列核酸内在的氧化还原活性和界面上电化学性质的变化(例如,电容、阻抗、电导率及电荷变化)。

DNA 的 4 种碱基中,电化学活性最高的是鸟嘌呤。将探针 DNA 中的鸟嘌呤核苷用次黄嘌呤核苷代替,杂交后出现的鸟嘌呤氧化峰说明了待测 DNA 序列及浓度[148]。然而,当电位超过＋0.90 V 时,电极表面污染造成很大的背景干扰电流,致使鸟嘌呤的氧化信号分辨率不高。使用精密的基线校正技术以及采用 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 作为电催化反应的媒介体能够为 DNA 分析提供较高的灵敏度。最近,Dominguez[149]采用多晶金电极直接吸附 DNA,基于方波伏安法观察到＋0.73 V 的鸟嘌呤氧化峰。Kerman 等[150]随后报道了直接检测 DNA 杂交的方法。

杂交引起的 DNA 界面的电化学性质变化也可用于直接检测[151]。例如,Shim 等[152]证明杂交后寡核苷酸修饰导电聚合物的导纳明显改变,并提出了一种基于测量阻抗的 DNA 传感器。杂交引起的表面负电荷的增加可被微型硅场效应晶体管传感器直接检测到。该方法首先将探针 DNA 以静电吸附固定在正电荷的聚 L-赖氨酸层上,聚 L-赖氨酸层有利杂交反应在低离子强度下进行,而此时场效应晶体管的灵敏度最高,几分钟内就可以实现纳摩尔浓度的检测,使用两个平行的传感器和微分检测技术甚至可以辨别 12 bp 长度寡核苷酸中的单碱基错配。鞠熀先等[151]将二茂铁基团标记的寡核苷酸固定在金电极表面,利用杂交过程对二茂铁基团与电极之间的电子传递的效率进行调节,发展了一种靶 DNA 序列的直接电化学检测方案(图 8.17)。单链探针 DNA 中的碱基呈无序排列,探针 DNA 关闭了二茂铁和电极之间的电子交换。然而当探针 DNA 与待检测的目标序列杂交后,通过互补配对原理生成的有序碱基对堆积为电子传递开启了一个 π 通道,杂交后二茂铁的阳极与阴极峰电流分别增大了 365%和 329%。

Janata 等[153]利用静电调节聚吡咯膜离子交换动力学性质实现了一种简单、直接检测杂交事件的方法。聚吡咯层与缓冲溶液间进行的氯离子交换受界面上的负电荷密度控制。使用 Mg^{2+} 桥联复合物连接聚合物上的碱性磷酸基团与 DNA 的磷酸基团,从而将探针 DNA 连接到聚吡咯表面。互补 DNA 杂交到探针 DNA 上引起负电荷密度增加,产生了具有较好峰形的循环伏安图。

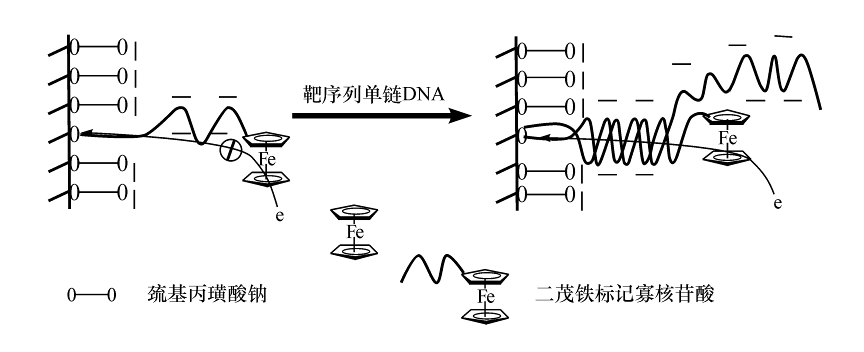


图 8.17 靶 DNA 序列的直接电化学检测原理

6. DNA 电化学传感器的选择性

电极表面上 DNA 的杂交基于碱基配对原则,具有极高的选择性。然而,在电极表面 DNA 的杂交是一个固相反应,其反应速率仅仅是溶液中的 1/100~1/10。因此,在考虑选择性的时候,也要考虑影响传感器-溶液界面上杂交速率的实验因素的影响。这些涉及溶液离子强度、温度、黏度、助杂交剂、杂交时间以及探针序列的长度。严格控制杂交,尤其是采用升高温度的方法,能够消除发生错配的可能性,但是降低了杂交效率。肽核酸(PNA)探针能够显著地改变杂交选择性,是解决这一问题的好方法。

通常有两种主要的方法来提高 DNA 生物传感器的选择性:一是基于探针 DNA 的选择(PNA 探针)以及杂交条件的控制(特别是温度);另一种方法是通过区别在完全配对与单碱基错配之间电子传递性质的差异[154,155]。

PNA 是 DNA 的类似物,起源于 20 世纪 80 年代,最初是为了发展新的序列特异性试剂并用于控制基因表达和发展抗过敏、抗原治疗药物。PNA 是非离子型、非手性的分子,不容易发生水解。尽管和天然 DNA 有着诸多不同,但是 PNA 依然能够遵循 Watson-Crick 氢键规则序列,特异性地键合到 DNA 以及 RNA 上。与传统的寡核苷酸探针 DNA 相比,PNA 和互补 DNA 形成的杂交复合物表现出了异常的热力学稳定性和特异性。然而,碱基错配的存在强烈地影响了 PNA/DNA 链的稳定性,与 DNA/DNA 链中的单个碱基错配相比,更容易发生离解。该性质能够显著地区分完全配对和碱基错配,因而将 PNA 探针用作 DNA 生物传感器识别层十分有利。

许多体系可显示出主体/受体标记的双链 DNA 中由光诱导产生的电子传递现象[156,157]。DNA 长程电子传递机制的阐述证明了长程电荷传递对距离有弱的依赖性,而对碱基对堆积中的扰动(如错配)却异常灵敏。因此,当单个碱基错配只引起双链稳定性与结构性质微弱变化时,对碱基对堆积产生的电子结构却造成十

分大的扰动。基于 DNA 长程电荷传递效率信号,可发展一种检测单碱基错配的方法[158]。该方法将巯基修饰的预先杂交的双链 DNA 在金电极表面自组装成生物识别界面,当双链完全配对时,氧化还原嵌入试剂(如道诺霉素)产生高分辨的电化学信号,然而在道诺霉素键合位点与电极间,单碱基错配的存在引起了电化学响应显著降低。

8.6 DNA 阵列

20 世纪 80 年代出现的核酸探针技术将待检标本固定在尼龙膜等固相载体支持物上,检测其中含探针序列的情况,开创了核酸杂交技术用于生命科学研究的新局面。随后出现的斑点和狭缝印记杂交、Southern 杂交和 Northern 杂交技术,克服了传统核酸杂交技术的局限性,可一次杂交了解多个探针序列。随着人类基因组计划的实施,已经积累了浩如烟海的基因序列信息,迫切需要建立一种方法可通过一次杂交了解细胞整体变化情况,并比较不同条件下细胞间基因表达水平上的差异。20 世纪 90 年代相继出现的差减杂交、抑制性差减杂交、栅格文库和差异显示等技术很大程度上满足了这种要求。但由于这些技术操作复杂、技术要求高,应用受到了限制。20 世纪 90 年代中期问世的 DNA 微阵列技术,以其高通量、操作简单、结果易于判读的优点而备受青睐,是分子生物学和微电子学结合产生的一种新技术。以 DNA 微阵列技术为核心的基因芯片技术于 1998 年被评为世界十大科技进展之一。

8.6.1 DNA 阵列的原理

DNA 微阵列(DNA microarray)是生物芯片技术之一。它将无数预先设计好的寡核苷酸、cDNA 或基因组 DNA 有序地高密度固定排列在载体上(玻璃、硅、塑料等硬质载体)制成点阵,通过与样品中同源核酸进行分子杂交,一次性检测和分析样品中的大量序列[159~161]。

DNA 微阵列是一种全新的反向固相杂交技术,与传统的斑点杂交和狭缝杂交相比,其最大创新之处在于它使用了载玻片这种刚性杂交载体,使 DNA 可以共价结合于处理后的载玻片表面,将杂交体积减少到最低,以促进探针和靶标的复性速度。同时载玻片韧性好,可以耐受高温和高离子强度的漂洗。且载玻片荧光本底低,不会造成很高的非特异性信号,因此可以用两种荧光素标记的探针同时杂交。

cDNA 是与 mRNA 互补的 DNA 分子,长约 0.2~5.0 kbp。cDNA 微阵列(cDNA microarray)是采用由 mRNA 反转录生成的 cDNA 作为探针制成的微阵列技术,最早的基因微阵列研究就是用 cDNA 微阵列进行的[162],至今 cDNA 微阵列技术仍然在基因表达检测上具有十分广泛的用途。据估计,cDNA 微阵列文献

占各种微阵列引文总数的 65%左右[163]。

cDNA 微阵列与寡核苷酸微阵列并称为核酸微阵列(nucleic acid microarray)。与寡核苷酸微阵列一样,cDNA 微阵列也是利用 Watson-Crick 碱基配对原理,通过分子杂交的化学过程产生微阵列信号,两者所包含的微阵列均以 DNA 或 RNA 作为探针分子。cDNA 微阵列中的 cDNA 探针长度一般为 0.5～2.5 kbp,用这样的分子制备的微阵列可产生很强的杂交信号,因为它们与溶液状态的荧光标记探针分子具有广泛互补性。cDNA 微阵列可以通过与靶分子杂交平行分析大量基因的 mRNA 表达谱,根据每个 cDNA 位置的荧光强度,可以定量测定对应的 mRNA 水平。这是因为稳态 mRNA 水平可以近似地反映基因表达水平。

8.6.2 DNA 阵列的制备

将探针 DNA 固定在玻片等芯片基质上即制成 DNA 微阵列,其固定的关键是载体的选择与活化、DNA 与载体的连接方法等,其方法主要有光引导原位合成法(light-directed synthesis)、压电打印原位合成法(piezoelectric printing in situ synthesis)、合成后交联法(off-chip DNA synthesis attachment)和微点样技术,下面将一一介绍[164～168]。

1. 载体的选择与活化

生物芯片技术是在一个有限的固相表面上刻印大量的生物分子(DNA、蛋白质)阵列。能用于连接、吸附或包埋各种生物分子以使其以水不溶性状态行使功能的固相材料统称为载体。能用于制作芯片的载体是固体片状或者是薄膜类,通常这些材料具有良好的光学性质,其表面具有各种不同的活性基因,能有效地固定靶标,允许靶标在其表面与探针分子稳定地进行杂交反应。此外载体应具有良好的生物兼容性以及足够的稳定性和相对惰性。稳定性是指在进行芯片制作或分子杂交时能经受一定的压力或酸碱条件而不发生变化。惰性是指载体的特异性吸附或其他性能都不会干扰生物分子的功能。

能用于生物芯片制作的载体材料很多,主要有普通玻片、硅片等钢性支持物和聚丙烯膜、硝酸纤维素膜、尼龙膜等薄膜型支持物,其中,玻片和硅片目前应用最为广泛。

为使 DNA 稳定地固定于载体表面,需对载体进行化学预处理,即载体的活化。目前有多种方法用来对载体表面进行化学预处理,其基本过程都是把玻片的硅表面根据不同的要求而活化成不同化学活性的表面,并进一步与活化试剂 EDC、NHS、*N*, *N*-二乙氧基氨基丙基三乙氧基硅烷等反应,在载体表面键合上活性基团,如氨基、环氧化物、巯基、醛基、肼基,形成具有生物特异性的亲和表面,用于固定蛋白质、核酸、多肽等生物活性分子。

2. DNA 分子的固定

载体表面经活化后可获得氨基、环氧化物、巯基、醛基、肼基等活性基团，其中最常用的有两种，即醛基和氨基修饰的玻片载体。醛基修饰的玻片在室温和中性条件下，通过醛基与靶标分子的氨基反应生成弱希夫碱，将待加样的 DNA 分子固定下来。用这种玻片制备基因芯片时，玻片表面的醛基可与 DNA 上的碱基 G、C、A、T 的芳香胺反应或与氨基修饰的寡核苷酸（或 DNA）反应形成希夫碱使蛋白质或 DNA 得以在载体上固定。如果用醛基修饰的玻片制备寡核苷酸芯片，则必须先在寡核苷酸的 5′端连接氨基碳臂，然后才能加样固定。

氨基修饰的玻片多用于制备 cDNA 芯片。氨基在中性条件下带正电荷，与 DNA 分子中带负电荷的磷酸基团结合形成离子键而被固定，经 UV 交联后进一步提高固定率。

多聚赖氨酸修饰的玻片主要通过物理吸附固定 DNA 分子。多聚赖氨酸为正电荷，易吸附带负电荷的核酸片段，适于固定几百个碱基的 cDNA 或 PCR 产物。在紫外线照射下，多聚赖氨酸可以和 DNA 上的胸腺嘧啶碱基之间形成共价键，从而进一步提高固定效率。但该类芯片不适于固定较短的寡核苷酸芯片。国内有人将多聚赖氨酸修饰的玻片与氨基修饰的玻片对 cDNA 的固定率和检测灵敏度进行了比较分析，证明后者对 cDNA 的固定率要优于前者。

巯基化修饰的玻片需先洁净处理，如酸处理、氨水处理等，然后用 MPTS 缓冲液对玻璃基片硅烷化处理，使其表面上形成巯基，然后再与相应的生物活性分子进行键合反应。此外在载体表面还可以通过分子自组装构建功能化的单分子层，以保证芯片的均质性。

3. 寡核苷酸芯片制备

寡核苷酸在基片表面共价固定能减少寡核苷酸在杂交过程中的解吸附，因此寡核苷酸的化学共价固定已成为固定方法研究的主要趋势。寡核苷酸芯片制备主要有以下几种方法。

1) 利用氨基修饰的玻片与 5′末端带氨基的寡核苷酸通过不同的交联分子(linker)连接

将空白玻片清洗干净，浸泡于含 1％的 3-氨基丙基三甲氧基硅烷的 95％丙酮溶液中 2 min，用丙酮洗数次，干燥，得到氨基修饰的玻片，再用如下方式连接寡核苷酸：

(1) 用 0.2％的 1,4-苯二异硫氰酸酯（嘧啶：DMF＝1：9）处理 2 h；也可用含 2％1-[3-(三甲氧基硅)丙基]-1-(4-异氰苯基)硫脲的丙酮/0.1 mol · L^{-1} NaOH

(19∶1)溶液将空白玻片处理 10 min,然后用甲醇和丙酮洗,储存于真空干燥器中。用点样仪将 5′端氨基修饰的寡核苷酸固定在玻片上,其连接方式如下:

$$\text{玻片}-Si-O-Si(OCH_3)_2-(CH_2)_3-NH-C(=S)-NH-C_6H_6-NH-C(=S)-NH-(CH_2)_6-O-P-O-(dT)_{15}-\text{寡核苷酸}$$

(2) 将氨基修饰的玻片浸泡于 5%的戊二醛中,室温处理 30 min,水洗 2 次,室温干燥,得到醛基修饰的玻片,将 5′端氨基修饰的寡核苷酸点在醛基修饰的玻片上,其结合方式为:

$$\text{玻片}(-O)_3Si-(CH_2)_3-NH_2 + HC(=O)(CH_2)_3-C(=O)H \longrightarrow \text{玻片}(-O)_3Si-(CH_2)_3-C(=O)-(CH_2)_3-C(=O)H$$

$$\xrightarrow[NaBH_4]{NH_2-\text{寡聚体}} \text{玻片}-NH-CH_2-(CH_2)_3-CH_2-NH-\text{寡聚体} \qquad (8.16)$$

(3) 用丁二酰亚氨基碳酸(DSC)、丁二酰亚氨基草酸(DSO)或丁二酸酐处理氨基修饰的玻片,再与 5′端氨基修饰的寡核苷酸连接,或采用氨基修饰的寡核苷酸与丁二酸酐反应后与氨基修饰的玻片反应。其结合方式如下:

$$\text{丁二酸酐} + NH_2-R \longrightarrow {}^{-}O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-R \qquad (8.17)$$

$$\equiv Si-(CH_2)_3-NH_2 + {}^{-}O-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-R \longrightarrow \equiv Si-(CH_2)_3-NH-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-R \qquad (8.18)$$

以上 3 种方法中,1,4-苯二异硫氰酸酯处理的玻片与氨基修饰的寡核苷酸结合较好,但试剂比较昂贵,制作成本高;用戊二醛处理方法简便,试剂价格低廉,但实际操作中戊二醛[$HCO\text{-}(CH_2)_3\text{-}OCH$]的两个醛基有可能由于线性分子的折叠而同时与玻片上的氨基结合,致使玻片表面游离的醛基密度降低,使对氨基修饰的寡核苷酸的固定量不足而影响杂交容量。

2) 硅烷化寡核苷酸直接点样于玻片上制成寡核苷酸微阵列

空白玻片超声波水洗 30 min,用 10%NaOH 溶液浸泡 30 min,而后用蒸馏水洗,80℃干燥 10 min 或室温干燥过夜。1 nmol · L^{-1} 5-硫代寡核苷酸与 5 nmol · L^{-1} 的 3-巯基丙基三甲氧基硅烷在 20 μl 乙酸钠或柠檬酸钠缓冲液中室温反应 10 min～2 h。5′-丙烯酸取代的寡核苷酸以同样的方法与巯基硅烷化试剂反应,反应式为:

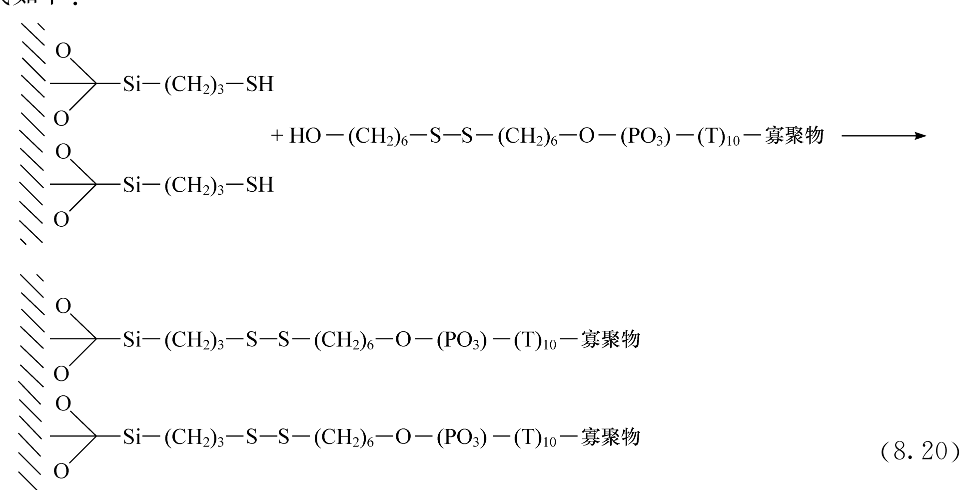
$$\text{寡核苷酸}—O—P(O_2)—O—(CH_2)_6—SH + HS—(CH_2)_3—Si—(OCH_3)_3 \longrightarrow$$

$$寡核苷酸—O—P(O_2)—O—(CH_2)_6—S—S—(CH_2)_3—Si—(OCH_3)_3 \tag{8.19}$$

使硅烷化核苷酸直接手工或通过自动点样仪点样于玻片上，置湿盒中室温放置 15 min，50 ℃烘干 5 min，玻片浸于沸水中 30 s 以除去未共价结合的核苷酸。这种方法省去了基片处理这一步骤，简便快捷，并可以获得理想的杂交信号，背景低，解决了常规芯片制作方法步骤烦琐的缺点，不失为一种好的芯片制作方法。

3）硫代寡核苷酸通过二硫键与巯基修饰的玻片连接

通过二硫键将硫代修饰的寡核苷酸连接到巯基修饰的玻片上，具体方法是：将玻片浸泡于 25％氨水中过夜，用 Milli-Q 水洗 10 min，再用无水乙醇洗，然后将玻片浸于含 1％3-巯基丙基三甲氧基硅烷、95％乙醇的 16 mmol · L^{-1} 乙酸（pH 4.5）缓冲液中 30 min，用 95％乙醇、16 mmol · L^{-1} 乙酸（pH 4.5）各洗一次，置氮气流吹干或真空炉 150 ℃干燥 2 h。巯基基团容易被氧化，最好在点样前用 DTT 脱保护。将 5′端二硫键修饰的寡核苷酸用 500 mmol · L^{-1} 的 $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 或 0.1 mol · L^{-1} 的柠檬酸缓冲液稀释成 0.01～40 μmol · L^{-1}，用 0.04 MDTT 脱保护后，点样于巯基修饰的玻片上，置湿盒中温育 5 min，过夜，然后用含 150 mmol · L^{-1} NaCl 和 0.05％Tween-20 的 10 mmol · L^{-1} Tris-HCl（pH 7.5）洗 3 次。其结合方式如下：



(8.20)

4. DNA 芯片制备

1）光引导原位合成法

第一步，将载体表面氨基化或羟基化。第二步，在羟基上加光敏保护基团，用

光敏保护基团将载体表面的氨基保护起来。第三步，当光线(如紫外线)通过罩在载体上的光刻掩蔽物(mask)时，有光线通过的部分光敏保护基团脱去，氨基被活化并与加入的一端连有光敏保护基团的脱氧核苷酸反应，使该单体分子连接到载体表面的氨基上。利用光照射使光罩掩蔽区的光敏基团被外源光线选择性地激活，用另一个有光敏基团修饰的脱氧核苷酸取代，然后用光罩保护新的确定区域，再进行上述过程。合成只在那些脱去保护基团的地方发生，光照区域就是要合成的区域。该过程可通过一系列掩蔽物来控制。如照相平版印刷掩膜(photolithographic mask)就是一种特制的保护玻片。掩膜具有间隔的不透明区和半透明区，照光时，光线透过半透明区，脱去光敏保护基团，在曝光部位利用 DNA 固相合成原理加上脱氧核苷酸，所加的核苷酸同样带有光敏保护基团。反复进行上述合成步骤，最终得到所需的寡核苷酸阵列。所需的寡核苷酸合成完毕后，对反应载体进行光照射以去除所有光敏保护基团。每次所加核苷酸的种类及其在玻片上的位置可预先设定。

这种方法可以在芯片上用最少的化学步骤，在特定位点任意合成所需要的寡核苷酸。只需提供所需要的序列就能够用互补序列制作高密度的 DNA 芯片。阵列上可以根据核苷酸信息制作不同的靶标，但要受到载体的物理大小的限制。这种方法的缺点是只能合成 20～25 nt 的寡核苷酸，而且每个芯片要用大量的掩蔽物，杂交及检测条件要求亦高。

目前大规模商业制作方法允许在 1.28 cm×1.28 cm 阵列上合成大约 300 000 个点阵，实验室中的每个芯片上已经超过 100 万个点阵。

原位合成法的另一个例子是半导体光刻技术，包括以下工艺：①在基片表面涂布光刻胶并模型化；②用光照方法来实现光刻胶的成像；③采用溶剂溶解的方法溶去玻片上的曝光或未曝光部分以达到显影的目的；④影像在基片表面的转移。初步策略是，先用 *N*, *N*-二乙氧基氨基丙基三乙氧基硅烷修饰玻片，再在其表面加上 4,4′-二甲氧基三苯甲基-六乙二醇基(2-氰乙基-*N*, *N*-二异丙基)氨基磷酸酯作为保护连接子，经上述程序处理后，再进行合成。表面涂布光刻胶，在设计好的掩蔽模板下曝光光刻胶，显影并用酸脱去三苯甲基保护基团，从而显露出活性羟基，这些活性羟基就可以与 DMT 保护的脱氧核苷酸氨基磷酸酯反应。此时将玻片安全地送入流通池中，用 DNA 合成仪把 DNA 合成的标准试剂送入流通池中，经过偶联、氧化、戴帽、脱保护和清洗程序，并不断地重复这些操作步骤，就可按照设计的 DNA 序列，构建不同密度、不同序列的寡核苷酸芯片。

2) 微点样技术制备 DNA 阵列

微点样技术(micro spotting)是利用手工或自动点样装置将预先制备好的寡核苷酸和 cDNA 样品按一定的排列规律点在经过特殊处理的玻璃片或其他基片

上,利用载体表面的活性基团与核苷酸分子作用形成共价或非共价结合,除去多余寡核苷酸分子并封闭多余活性基团,即制成DNA微阵列(图8.18)。微点样技术是2000年美国TeleChem公司Martinsky的创意,它是一种广泛应用的微阵列制作方法。这种接触印刷技术使用一套运动控制系统,其中安装了一个支架或点样头以及一个或多个微点样针,可以制备含有绝大部分的化学或生物样品的微阵列。自动微点样方式主要有接触点样(contact printing)和非接触喷点(non-contact ink jet printing)两类。接触点样是通过针点(pin printing)完成的,将较为坚硬的针头浸到样品中,使针头蘸取少量液体,当针头与固相表面接触时,液体因玻片的表面能而落在玻片表面。针头有实心针(solid pin)、裂缝针(split pin)、毛细管针(capillary tube)、圈套针(pin and ring)等。

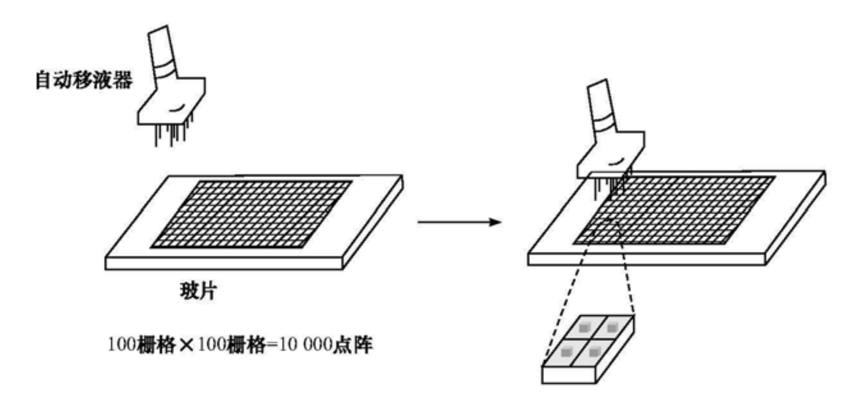


图8.18　微点样技术的基本原理

非接触喷点又分两种,其一是用压电晶体使液体从孔中喷出的压电技术(piezoelectric technology),其二是注射器螺线管技术(syringe solenoid technology),它通过高分辨率注射器泵和微螺线管阀门的有机结合来精确控制液滴。

点样后的芯片在用于杂交前还必须进行再水合和快速干燥、紫外线交联、封闭和变性等一系列后处理,以改善DNA在点内的分布,增加稳定结合到各点上的可杂交DNA的数量。将载体上剩余的活性基团进行封闭,是为了降低它们结合标记DNA探针的能力,否则这些活性基团将无限制地、非特异性地与标记探针结合,产生过高的本底信号。

8.6.3　DNA阵列的应用

DNA微阵列作为一种高通量分析方法已成为在基因组水平上分析转录和表达图谱研究基因功能的常规方法(图8.19)。它不仅可以用于分析细胞mRNA含量(即转录组),而且由于其基于原位杂交,可用来分析任何核酸分子,如基因组

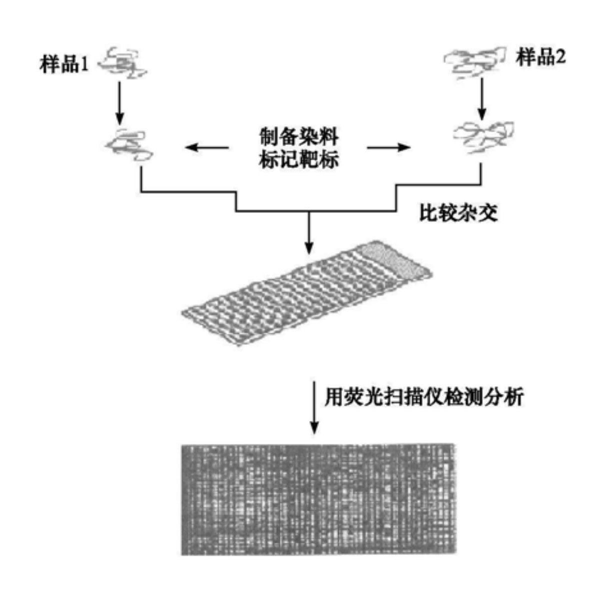


图 8.19　DNA 阵列用于基因表达谱分析流程图

DNA、质粒 DNA、mRNA 或非成熟 mRNA 以外的其他任何 RNA。

DNA 芯片不仅可以用于基因表达分析，以揭示基因是否表达、上调或下调，了解完整的基因转录和调控过程，还可从上千个样品中的数以万计的基因座中探查等位基因的异同，提供由于基因异常引起的疾病的信息，也可用于生物基因型分类和基因多态性、细胞因子、黏附分子、受体、离子通道、信号转导、生物大分子化学、细胞周期、应激反应、翻译调控、细胞凋亡、肿瘤鉴定等研究，在疾病和肿瘤诊断、药物靶标筛选、药物评价等方面有重要的用途。

1. 比较基因组研究

在基因组学研究中，通过检测特定基因表达的水平可以揭示许多问题。例如，在特定的染色体或人工酵母染色体中，哪些基因发生表达；在肿瘤细胞中，哪些基因被激活，哪些基因表达上调，哪些基因表达被抑制；在特定时空条件下哪些细胞的哪些基因优先表达。用微阵列技术进行分析就可以回答这些问题。

分析基因组时，检测和确定复杂 DNA 样品中各种不同序列的相对丰度是非常困难的。利用荧光标记的 DNA 微阵列方法，可解决这个难题[169]。将 864 个酵母基因组 DNA 的 λ 克隆（占酵母基因组的 75%以上）排列在 1.8 cm× 1.8 cm 的玻璃基片上，总共含有 1744 个点阵单元。在这种微阵列中，标记不同荧光基团的两套不同的分离酵母染色体可同时发生杂交。用激光荧光扫描仪检测来自两种荧光基团的杂交信号，可分析复杂的 DNA 样品。该系统在全基因组的遗传作图、物理作图和基因表达研究等方面有着广泛用途。

基因芯片可用于由于基因修饰而影响基因表达改变的研究。肿瘤细胞中 DNA 的异常甲基化可以导致一些癌基因及转移相关基因表达的改变。Melanie 等[170]使用 4000 个基因的芯片 GF211 研究去甲基化处理前后的高转移性乳腺癌细胞系的基因表达谱,证实了 DNA 异常甲基化是导致 nm23-H1 表达下调的原因之一。

2. 肿瘤研究中的应用

癌症的发生和发展伴随着复杂的基因表达谱的变化,cDNA 微阵列为研究这些复杂现象提供了一种强大的分析工具。目前它在肾癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢上皮癌、白血病、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、霍奇金病等方面都有应用,主要用于肿瘤分类和分型、分期和分级、肿瘤诊断和预后、肿瘤相关基因和分子遗传标记鉴定、肿瘤治疗和疗效监测、抗癌药物筛选和检测抗肿瘤治疗效果等方面。

人黑色素瘤细胞系 UACC-903 的致瘤特性可以通过导入正常的 6 号染色体而得到抑制。DeRisi 等[171]构建了含 1161 个 cDNA 探针的高密度微阵列,研究了引入 6 号染色体的黑色素瘤细胞系中与肿瘤抑制相关基因的表达差异。用于杂交的荧光探针来源于两种细胞 mRNA[UACC-903 和 UACC-903(+6)],并标记了不同的荧光素,分析阵列上每个基因杂交的荧光信号,可确定每个基因对应的两种 mRNA 样品中的相对丰度。那些以前未发现的特定基因表达的改变则提供了进一步研究这些细胞致瘤表型遗传基础的线索。

有些类型的肉瘤、淋巴瘤和白血病肿瘤由于体细胞获得性染色体易位,产生融合基因,编码具有致瘤特性的嵌合转录因子。Khan 等[172]用含有 1238 个cDNA的微阵列研究了一组共 7 个泡状横纹肌肉瘤(ARMS)细胞系(该细胞系的特征是存在 PAX3-FKHR 融合基因)的基因表达谱。采用多维测度法(multidimensional scaling)描述该细胞系在二维欧氏空间里的相互关系,确定了 ARMS 细胞表现一致的表达谱,从而将这些细胞进行聚类。通过检查这些细胞系,发现这 1238 个基因中有 37 个基因在 ARMS 细胞中表达非常恒定,其中只有 3 种基因以前报道过在 ARMS 中表达。这 37 种基因中,有的与 ARMS 中原发性(PAX3-FKHR)和继发性(CDK4)遗传改变均相关。这些结果表明,cDNA 微阵列技术可以用于揭示人类肿瘤的肿瘤特异性基因表达图谱。

Heiskanen 等[173]将 cDNA 微阵列技术、比较基因组杂交(CGH)技术和组织微阵列技术结合起来,检测到成纤维细胞生长因子受体 2 基因(FGFR2)在乳腺癌中的低频扩增。乳腺癌细胞系 SUM-52 中存在几个高水平 DNA 扩增位点,其中包括 FGFR2 所在的染色体区域 10q26。首先利用 CGH 技术检测基于细菌人工染色体克隆的微阵列,发现 FGFR2 在 SUM-52 细胞中有高水平扩增,然后用含 588 个基因的 cDNA 微阵列检测到 FGFR2 在 SUM-52 细胞中的过度表达(超过 40

倍)，最后用荧光原位杂交(FISH)检测了750例原发性乳腺癌标本的组织芯片，结果显示FGFR2只在1%原发性乳腺癌患者体内扩增。

许多基因和信号传导参与肾癌细胞(RCC)的发展。为了分析与RCC相关的基因，鉴定肿瘤遗传标记，用于RCC的诊断和预后，Moch等[174]用5184个cDNA克隆的cDNA芯片检测了肾癌细胞系CRL-1933和正常肾细胞中差异表达的基因，发现肾癌细胞系中有89个差异表达的基因，其中一个基因编码为波形蛋白(vimentin，一种胞浆中间丝)。然后，用含有532个RCC标本的肾癌组织芯片通过免疫组织化学分析确定了其中波形蛋白的表达。这些微阵列研究结果与以前有关肾癌的发现非常相符，表明cDNA微阵列和细胞芯片的结合为快速鉴定和深入评价在肾癌生物学中发挥重要作用的基因提供了有力工具。

尽管肿瘤分类在过去的几十年中取得了很大进展，但缺少一种通用方法来鉴定新的肿瘤类型(发现肿瘤类型)或将肿瘤归类(推测肿瘤类型)，而通过DNA芯片监测基因表达则提供了一种一般分类方法。在事先不知其类型的情况下，可以通过此方法自动发现急性髓细胞白血病(AML)和淋巴细胞白血病(ALL)的差别。这种自动推导的分类系统可确定新白血病的类型。

乳腺癌细胞基因型的改变是转移能力表型改变的分子基础。如ER阴性，c-erbB2阳性和突变型p53阳性等均为乳腺癌患者预后不良的分子特征。基因芯片可以同时检测众多影响细胞转移能力的基因，根据这些基因可以对肿瘤进行准确的分子分型，从而进行乳腺癌转移潜能与患者生存率的预测。Charles等[175]使用含8102个cDNA的芯片分析65例乳腺组织样本的基因表达谱，将基因芯片用于乳腺癌的分子分型及各型乳腺癌的预后预测。Francois等[176]使用含1045个基因的芯片分别对11个乳腺癌细胞系和55例经蒽环类化合物化疗后患者的基因表达谱进行分析，并根据表达谱的相似性将66个乳腺癌细胞的基因表达谱分为3类，利用基因芯片分析化疗前后基因表达谱的改变预测化疗后乳腺癌患者的预后。利用寡核苷酸探针制得芯片检测乳腺癌基因[如BRCA1的exon11(3.45 kb)]中所有可能的碱基置换、插入或缺失(1～5 bp)突变，可进行乳腺癌的诊断。Affymetrix公司已开发出恶性肿瘤的早期诊断基因芯片。

Chen等[177]用cDNA芯片检测了大豆异黄酮金雀异黄素对膀胱癌的生长抑制作用。以50 $mmol \cdot L^{-1}$剂量处理膀胱癌细胞，提取处理和未处理的膀胱癌细胞mRNA制成探针，与含有884个已知序列的cDNA芯片杂交，发现差异表达主要是编码调控信号转导和细胞周期蛋白的基因，这些基因可作为研制抗肿瘤药物的靶标。

3. 在其他疾病研究中的应用

cDNA芯片可以筛查疾病调控基因、特异性表达基因、异常表达基因，筛选生

物标记和药物靶标。cDNA 微阵列技术广泛用于描绘疾病分子特征和寻找新的疾病相关基因。不同类型细胞的表达模式对病理过程具有不同程度的影响。通过比较炎症性肠病和药物处理细胞的基因表达谱,可以鉴定炎症性肠病治疗和药物筛选的分子靶标基因。Heller 等[178]用 cDNA 微阵列技术分析了两种炎性疾病(类风湿性关节炎和炎症性肠病)的基因表达情况,cDNA 微阵列是用挑选的可能对炎症具有意义的基因以及表达于外周血单个核细胞的基因制备的。培养的巨噬细胞、软骨细胞系、原代软骨细胞和滑膜细胞的 mRNA 水平提供了细胞因子、趋化因子、DNA 结合蛋白和降解基质的金属蛋白酶的表达谱。运用微阵列技术对这两种疾病组织样品进行比较,发现了涉及其中的许多基因,同时还发现白介素 3(IL-3)、趋化因子 Gro α 和金属蛋白酶基质金属弹性蛋白酶等因子也参与引发了这两种疾病。通过对外周血文库鉴定发现,类风湿性关节炎与炎症性肠病相比,金属蛋白酶组织抑制剂、铁蛋白轻链和镁超氧化物歧化酶基因的表达有差异。这些结果显示 cDNA 芯片系统可用于疾病研究。

哮喘的病理机制和易感性涉及遗传因子和环境因子的复杂相互作用。其相互作用调节气管炎症和气道重塑过程(甚至见于轻度哮喘),并控制气道高反应性症状的出现及其严重性。用表达微阵列芯片从哮喘患者组织中鉴定出了 79 个有显著表达差异的基因,其中包括 21 个以前鉴定的哮喘相关基因(如 NOS2A 和 GPX3)以及几个新的潜在候选基因(如 ALOX15、CTSC 和 CX3CR1)。实行皮质激素吸入疗法后,上述差异表达基因的 1/3 的 mRNA 表达水平部分或完全发生回复。从健康和哮喘患者支气管活检样品中发现的独特基因表达谱差异,有助于全面了解哮喘发生的病理生理过程。

4. 在细菌学研究中的应用

DNA 微阵列技术可以用于细菌鉴定和分类,研究细菌与宿主的相互作用,筛选诊断抗原和候选疫苗等。

DNA 微阵列技术可以作为一种有力工具用来研究细菌性病原体和宿主的复杂相互作用。铜绿假单胞杆菌是一种条件性致病菌,在囊性纤维化患者肺功能衰退中起着重要作用。Ichikawa 等[179]用从铜绿假单胞杆菌感染的Ⅱ型肺细胞系 A549 中提取的 RNA 制备荧光标记探针,用高密度 DNA 微阵列(由 1506 个人 cDNA 克隆组成)监测了感染的 A549 细胞中的基因表达,从中鉴定出细菌感染后差异表达的基因。其中有些基因需要与铜绿假单胞杆菌相互作用和 IV 型菌毛主要亚单位的表达。差异表达的基因包括参与各种细胞功能的基因,如编码转录因子干扰素调节因子 1(IRF-1)的基因。A549 细胞用铜绿假单胞杆菌黏附后,其中 IRF-1 转录水平升高 3～4 倍。A549 细胞接种野生型铜绿假单胞杆菌后也可见到类似的 IRF-1 mRNA 增加,但当细菌温育过程中有血清存在时,这种差异则被消除。

陈永青等[180]利用含有 12 800 个全长或部分基因的基因芯片研究了结核分枝杆菌无毒株入侵导致的人巨噬细胞 U937 全基因组在转录水平的表达谱变化，发现其中有 473 个基因（占 3.7%）差异表达。表达上调的基因有 25 个（5.3 %），使表达上调超过 3 倍的基因包括丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶、可溶性结合半乳糖苷的凝集素、蛋白质酪氨酸磷酸酶 δ、DDR 受体酪氨酸激酶等的编码基因，其余基因（94.7%）均使表达下调。在表达下调的基因中，表达仅为原来 1/3 以下的有 25 个，其中 syndecan 结合蛋白的表达为原来的 1/13.5。基因芯片的研究结果与结核分枝杆菌一般抑制宿主细胞免疫应答的趋势相符。这 473 个基因中的 376 个基因在 GenBank 中有记录，另外 97 个是新基因。生物信息学分析提示，差异表达基因编码产物与细胞内信号转导、细胞因子反应、细胞骨架重建、细胞凋亡、铁代谢、电子传递、线粒体功能和离子通道等有关。在这些差异表达基因中，有 17 个是文献报道过的，并且结果一致。RT-PCR 和 Northern 杂交实验确证了表达谱芯片的研究结果。通过 DNA 芯片研究整体表达谱变化，揭示了细菌入侵早期所导致的巨噬细胞表达的改变，为深入研究细菌与宿主的相互作用提供了数据和线索。

Grifantini 等[181]用全基因组微阵列研究了与上皮细胞相互作用后 B 群脑膜炎奈瑟菌（MenB）和乳糖发酵奈瑟菌（*N. lactamica*，一种人类共栖菌）中的差别基因调节。宿主-细胞接触分别在两种细菌中引起 347 种和 285 种基因的表达变化，其中只有 167 种是二者共有的，表明致病菌和共栖菌可激活不同亚类的基因。基因表达谱显示，大约 40%的上调基因编码表面相关蛋白，表明接触细胞后奈瑟菌发生相当大的表面重构。用 12 种重组蛋白鼠血清黏附细菌经 FACS 分析证实了这点。12 种黏附激活的表面抗原中有 5 种能诱导杀菌性抗体，进一步说明微阵列技术可以用来鉴定新的候选疫苗。

此外，用 DNA 芯片还研究了衣原体与宿主细胞的相互作用[182]、脑膜炎奈瑟菌（*N. meningitidis*）感染[183]以及苜蓿根瘤菌（*Sinorhizobium meliloti*）共生时[184]宿主的转录组、小肠结肠炎耶尔森菌（*Yersinia enserocolitica*）致病因子（Inv 和 YopP）调节上皮细胞的基因表达谱[185]。

鉴定适合的抗原对于研制亚单位疫苗十分关键。现有的很多鉴定候选疫苗（暴露于表面或分泌性、有免疫原性、保守性、含有 B 细胞和 T 细胞表位）的方法有一个主要缺点，即不能获得关于病原感染过程中是否确实表达了某种抗原的任何信息。DNA 芯片则提供了研究病原微生物所有基因的体内转录活性的新工具。Behr 等[166]利用 DNA 芯片技术发现结核分枝杆菌 BCG 疫苗株（卡介苗）的基因缺失区位于强毒株 H37RV 株的毒力相关区，另外还发现了 38 个 ORF 在牛分枝杆菌中存在而在所有或部分 BCG 菌株中缺失，这些发现有助于设计更好的结核诊断试剂和疫苗株。

5. 在病毒学研究中的应用

用于疾病诊断的微阵列中含有基因组特异性探针，能捕获未知的病毒靶序列，从而揭示该病毒在待检样品中的存在性，并进行病毒基因型鉴定与变异规律和表达谱分析。Li 等[186]用编码 A 型和 B 型流感病毒基因片段的 cDNA 构建 DNA 微阵列，用双色荧光标记探针，检测流感病毒的靶标 DNA(包括 HA、NA 和 M 蛋白基因)，对序列未知的流感病毒毒株进行血清型和亚型鉴定，表明 DNA 微阵列作为一种新型分子诊断和鉴定工具是 PCR 检测方法的有益补充。Park 等[187]用 HPV DNA 芯片检测 HPA，根据细胞病理诊断将涉及的 471 位患者分为 4 群，即正常(290 位)、低度鳞状上皮内病变(68 位)、高度鳞状上皮内病变(51 位)和侵袭性宫颈癌(55 位)，各群 HPV 检出率分别为 17.6%(51/290)、73.5%(50/68)、92.2%(47/51)和 95.2%(59/62)。HPV-16 是所有检测标本中最常见的基因型(21.8%)，可增加宫颈病变程度，使得流行率显著升高。其次是 HPV-18 和 HPV-58。上述 4 群中 HPV 多重感染的流行率分别为 37.3%、43.7%、27.7% 和 28.8%，各群间没有显著差异，表明 DNA 芯片是检测宫颈癌样品中 HPV 和基因型鉴定的一种较敏感诊断工具。

参 考 文 献

[1] Clark L C. *Jnr. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*. 1956, **2**: 41
[2] Clark L C. *Jnr. Ann. NY Acad Sci*. 1962, **102**: 29
[3] Mosbach K, Danielsson *B. Biochim. Biophys. Acta*. 1974, **364**: 140
[4] Coonev C L, Weaver J C, Tannebaum S R et al. In: Pye E K, Wingar L B. Jnr. Enzyme engineering. New York: Plenum. 1974, **2**: 411
[5] Voelkl K P, Opitz N, Lubbers D W et al. *Anal. Chem*. 1980, **301**: 162
[6] GuilbauIt G G. *Anal. Chem*. 1983, **55**: 1682
[7] Liedberg B, Nylander C, Lundstrm I. *Sens. Actuators*. 1983, **4**: 299
[8] Cass A E G, Francis D G, Hill H A O et al. *Anal. Chem*. 1984, **56**: 667
[9] 张先恩. 生物传感器. 北京：化学工业出版社，2005
[10] Prabakaran P An J, Gromiha M M, Selvaraj S. *Bioinformatics*. 2001, **17**: 1027
[11] Cheng Z, Luo L, Wu Z. *Electroanal*. 2001, **13**: 68
[12] Singhal R, Chaubey A, Srikhirin T et al. *Current Applied Physics*. 2003, **3**:
[13] Singhal R, Takashima W, Kaneto K et al. *Sens. Actuators B*. 2002, **86**: 42
[14] Olsen E V, Pathirana S T, Samoylov A M et al. *J. Microbiol. Methods*. 2003, **53**: 273
[15] Tien H T. *J. Phys. Chem*. 1984, **88**: 3172
[16] Tien H T, Salamon Z. *Bioelectlochem. Bioenerg*. 1989, **22**: 211
[17] Tine H T, Wang L G, Wang X et al. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1997, **42**: 161
[18] Nikolelis D P, Krun U J. *Anal. Chim. Acta*. 1994, **288**: 187
[19] Kong J L, Lu Z Q, Lvov Y M. *J. Am. Chem. Soc*. 1998, **120**: 7371

[20] Davis G. In: Turner A P F et al. Biosensors: Fundamentals and applications. Oxford Sci Pub, 1987. 249

[21] Eddows M J, Hill H A O. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1977, **21**: 771

[22] Yeh P, Kuwana T. *Chem. Lett.* 1977, **70**: 1145

[23] Grealis C, Magner E. *Langmuir.* 2003, **19**: 1282

[24] Reed D E, Hawkridge F M. *Anal. Chem.* 1987, **59**: 2334

[25] Rosatto S S, Kubota L T, de Oliveira Neto G. *Anal. Chim. Acta.* 1999, **390**: 65

[26] Salamon Z, Hazzard J T, Tollin G. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1993, **90**: 6420

[27] Rusling J F. *Acc. Chem. Res.* 1998, **31**: 363

[28] Chen X, Hu N, Rusling J F et al. *Langmuir.* 1999, **15**: 7022

[29] Ye J, Baldwin R P. *Anal. Chem.* 1988, **60**: 2263

[30] Xiao Y, Ju H X, Chen H Y. *Anal. Chim. Acta.* 1999, **391**: 73

[31] Xiao Y, Ju H X, Chen H Y. *Anal. Biochem.* 2000, **278**: 22

[32] Crumbliss A L. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, **40**: 483

[33] González-Garća M B, Fernández-Sánchez C, Costa-Garća A. *Biosens. Bioelectron.* 2000, **15**: 315

[34] Liu S Q, Ju H X. *Anal. Biochem.* 2002, **307**: 110

[35] Liu S Q, Yu J H, Ju H X. *J. Electroanal. Chem.* 2003, **540**: 61

[36] Liu S Q, Ju H X. *Electroanal.* 2003, **15**: 1488

[37] Liu S Q, Ju H X. *Biosens. Bioelectron.* 2003, **19**: 177

[38] Liu S Q, Ju H X. *Analyst.* 2003, **128**: 1420

[39] Freeman R G., Grabar K C, Allison K J et al. *Science.* 1995, **267**: 1629

[40] Patolsky F, Gabriel T, Willner I. *J. Electroanal. Chem.* 1999, **479**: 69

[41] Jia J B, Wang B Q, Wu A G et al. *Anal. Chem.* 2002, **74**: 2217

[42] Buscher C T, Mcbranch D, Li D Q. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**: 2950

[43] Fang M, Kaschak D M, Sutorik A C et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, **119**: 12184

[44] Liu S Q, Dai Z H, Chen H Y et al. *Biosens. Bioelectron.* 2004, **19**: 963

[45] Mal N, Fujiwara M, Tanaka Y. *Nature.* 2003, **421**: 350

[46] Dai Z H, Liu S Q, Chen H Y et al. *Electroanal.* 2005, **17**: 1571

[47] Dai Z H, Xu X X, Ju H X. *Anal. Biochem.* 2004, **332**: 23

[48] Dai Z H, Liu S Q, Ju H X, et al. *Biosens. Bioelectron.* 2004, **19**: 861

[49] Xu X, Tian B Z, Kong J L et al. *Adv. Mater.* 2003, **15**: 1932

[50] Updike S J, Hicks J P. *Nature.* 1967, **214**: 986

[51] Yuan J H, Wang K, Xia X H. *Adv. Func. Mater.* 2005, **15**: 803

[52] Song Y Y, Zhang D, Xia X H. *Chem. Eur. J.* 2005, **11**: 2177

[53] Zhao H T, Ju H X. *Anal. Biochem.* 2006, **350**: 138

[54] Blaedel W J, Engstrom R C. *Anal. Chem.* 1980, **2**: 1691

[55] Yao T, Musha S. *Anal. Chim. Acta.* 1979, **110**: 203

[56] Mascini M, Fortunati S, Moscone D et al. *Clin. Chem.* 1985, **31**: 451

[57] Mascini M, Guilbault G G. *Anal. Chem.* 1977, **49**: 795

[58] Nanjo M, Guilbault G G. *Anal. Chem.* 1974, **46**: 1769

[59] Karashima T, Rechnitz G A. *Anal. Chim. Acta.* 1976, **82**: 9

[60] Mizutani F, Karube K T, Matsumoto S S. *Anal. Chim. Acta*. 1980, **118**: 65

[61] Wang J, Femandes J R, Kubota L T. *Anal. Chem*. 1998, **70**: 3699

[62] Sole S, Alegret S, Cespedes F. *Anal. Chem*. 1998, **70**: 1462

[63] Santandreu M, Cespedes F, Alegret S. *Anal. Chem*. 1997, **69**: 2080

[64] Janata J. *J. Am. Chem. Soc*. 1975, **97**: 2914

[65] Newman A L, Hunter K W, Stanbro W D. Proc 2nd Int-Meet on Chemical Sensors, Bordeaux, 1986. 596

[66] Lu B, Iwuoha E I, Smyth M R. *Anal. Chim. Acta*. 1997, **345**: 59

[67] Wendzinski F, Gründig B, Renneberg R. *Biosens. Bioelectron*. 1997, **12**: 43

[68] O'Daly J P, Henkens R W, Zhao J. US Patent, 1995, **391**: 272

[69] Rishpon J, Ivnitski D. *Biosens. Bioelectron*. 1997, **12**: 195

[70] Crowley E, O'sullivan C, Guilbault G. *Anal. Chim. Acta*. 1999, **389**: 171

[71] Xu Y H, Suleiman A A. *Anal. Lett*. 1997, **30**: 2675

[72] Benkert A, Scheller F, Schösslere W. *Anal. Chim*. 2000, **72**: 916

[73] Wilmer M, Renneberg T, Spener F. *Anal. Lett*. 1997, **30**: 515

[74] Dai Z, Chen J, Yan F et al. *Cancer Detect. Prev*. 2005, **29**: 233

[75] Du D, Yan F, Liu S L et al. *J. Immuno. Methods*. 2003, **283**: 67

[76] Dai Z, Yan F, Chen J et al. *Anal. Chim*. 2003, **75**: 5429

[77] Chen J, Yan F, Dai Z et al. *Biosens. Bioelectron*. 2005, **21**: 330

[78] Dai Z, Yan F, Yu H et al. *J. Immuno. Methods*. 2004, **287**: 3

[79] Yu H, Yan F, Dai Z et al. *Anal. Biochem*. 2004, **221**: 98

[80] Wilson M S. *Anal. Chim*. 2005, **77**: 1496

[81] Shons A, Dorman F, Najarian J. *J. Biomed. Mater. Res*. 1972, **6**: 565

[82] Chou S F, Hsu W L, Hwang J M et al. *Anal. Chim. Acta*. 2002, **453**: 181

[83] Wang A W, Kiwan R, White R M et al. *Sens. Actuat B*. 1998, **49**: 13

[84] Mattiasson B, Borrebaeck C, Sanfridson B. *Biochim. Biophys. Acta*. 1977, **483**: 221

[85] Bimbaum S, Bulow L, Hardy K. *Anal. Biochem*. 1986, **158**: 12

[86] Urban G, Kamper H, Jachimowicz A. *Biosens. Bioelectron*. 1991, **6**: 275

[87] 杨维平，章竹君. 陕西师范大学学报. 1999, **27**: 76

[88] Sasamoto H, Maeda M, Tsuji A et al. *Anal. Chim. Acta*. 1995, **309**: 221

[89] Xue M D, Haruyama T, Kobatake E et al. *Sens. Actuat. B*. 1996, **36**: 458

[90] Mack M, Oed M, Amtmann R et al. *J. Cancer A*. 1997, **33**: S52

[91] Lin J H, Yan F, Ju H X. *Applied Biochem. Biotech*. 2004, **117**: 93

[92] Lin J H, Yan F, Ju H X. *Clin. Chim. Acta*. 2004, **341**: 109

[93] Lin J H, Yan F, Hu X Y et al. *J. Immunol. Methods*. 2004, **291**: 165

[94] Chou S F, Hsu W L, Hwang J M et al. *Biosens. Bioelectron*. 2004, **19**: 999

[95] Romette J L. *Biotechnol. Bioeng*. 1983, **25**: 2557

[96] Yamauchi H. *Abst. Euro. Congr. Biotech*. I-705-10

[97] Chen C T, Su Y G. *Abst Biosensors'90*. Elsevier Sci. Publicat Ltd., 1990. 80

[98] Miyamoto S. *Abst Biosensors'90*. Elsevier Sci. Publicat Ltd., 1990. 75

[99] Guilbault G G. *Anal. Chim*. 1983, **55**: 1582

[100] Matsumoto K. *Anal. Chim.* 1981, **53**: 1974

[101] Renneberg R. *Anal. Lett.* 1983, **16**: 877

[102] Aizawa M. *Anal. Chim. Acta.* 1974, 69: 431

[103] Ikeda T. *Abst Biosensors'90*. Elsevier Sci. Publicat Ltd. 1990. 72

[104] Marty J I. *Abst Biosensors'90*. Elsevier Sci. Publicat Ltd. 1990. 85

[105] Kandimalla V B, Ju H X. *Chem. Eur. J.* 2006, **12**: 1074

[106] Paleček E, Davidson J N, Cohn W E. In progress in nucleic acids research and molecular biology. Academic Press, New York. 1969, **9**: 31

[107] Jelen F, Tomschik M, Paleček E. *J. Electroanal. Chem.* 1997, **423**: 141

[108] Wang J, Cai X H, Jonsson C et al. *Electroanal.* 1996, **8**: 20

[109] Wang H S, Ju H X, Chen H Y. *Electroanal.* 2001, **13**: 1105

[110] Wang H S, Ju H X, Chen H Y. *Anal. Chim. Acta.* 2002, **461**: 243

[111] Wang H S, Ju H X, Chen H Y. *Electroanal.* 2002, **14**: 1615

[112] Paleček E. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1992, **28**: 71

[113] Wang J, Cai X, Rivas G et al. *Biosens. Bioelectron.* 1997, **12**: 587

[114] Paleček E, Fojta M, Tomschik M et al. *Biosens. Bioelectron.* 1998, **13**: 621

[115] Li L, Wang M, Dong S et al. *Anal. Sci.* 1997, **13**: 305

[116] Brett A M O, Serrano S H P, Gutz I et al. *Electroanal.* 1997, **9**: 1132

[117] Marrazza G, Chianella L, Mascini M. *Biosens. Bioelectron.* 1999, **14**: 43

[118] Pantano P, Morton T H, Kuhr W G. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, **113**: 1832

[119] Millan K M, Mikkelsen S R. *Anal. Chim.* 1993, **65**: 2317

[120] Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y. *Anal. Chim.* 1994, **66**: 3830

[121] Sun X, He P, Liu S et al. *Talanta.* 1997, **47**: 487

[122] Moser I, Schalkhammer T, Pittner R et al. *Biosens. Bioelectron.* 1997, **12**: 729

[123] Livache T, Roget A, Dejean E et al. *Nucleic Acids Res.* 1994, **22**: 2915

[124] Paleček E, Boublikova P, Jelen F. *Anal. Chim. Acta.* 1986, **187**: 99

[125] Xu C, He P, Fang Y. *Anal. Chim. Acta.* 2000, **411**: 31

[126] Lumley-Woodyear T, Campbell C N, Heller A. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**: 5504

[127] Ihara T, Nakayama M, Murata M et al. *Chem. Commun.* 1997, **17**: 1609

[128] Sato S, Fujii S, Yamashita K et al. *J. Organomet. Chem.* 2001, **637**: 476

[129] Xu X H, Bard A J. J. *Am. Chem. Soc.* 1995, **117**: 2627

[130] Pyle A M, Rehmann J P, Meshoyrer R et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, **111**: 3051

[131] Paleček E, Billová S, Havran L et al. *Talanta.* 2002, **56**: 919

[132] Gu J Y, Lu X J, Ju H X. *Electroanal.* 2002, **14**: 949

[133] Ju H X, Ye Y K, Zhu Y L. *Electrochim. Acta.* 2005, **50**: 1361

[134] Ye Y K, Zhao J H, Yan F et al. *Biosens. Bioelectron.* 2003, **18**: 1501

[135] Ju H X, Ye Y K, Zhao J H et al. *Anal. Biochem.* 2003, **312**: 255

[136] Lee T M H, Hsing I M. *Anal. Chim.* 2002, **74**: 5057

[137] Zhao H T, Ju H X, *Electroanal.* 2004, **16**: 1642

[138] Paleček E, Kizek R, Havran L et al. *Anal. Chim. Acta.* 2002, **469**: 73

[139] Wlassoff W A, King G C. *Nucleic Acid Res.* 2002, **30**: 58

[140] Patolsky F, Katz E, Bardea A et al. *Langmuir*. 1999, **15**: 3703
[141] Patolsky F, Lichtenstein A, Kotler M et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2001, **40**: 2261
[142] Wang J, Xu D K, Kawde A N et al. *Anal. Chim*. 2001, **73**: 5576
[143] Wang J, Xu D K, Polsky R. *J. Am. Chem. Soc*. 2002, **124**: 4208
[144] Ozsoz M, Erdem A, Kerman K et al. *Anal. Chim*. 2003, **75**: 2181
[145] Wang J, Li J H, Baca A J et al. *Anal. Chim*. 2003, **75**: 3941
[146] Willner I, Patolsky P, Wasserman J. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2001, **40**: 1861
[147] Ye Y K, Ju H X. *Biosen. Bioelectron*. 2005, **21**: 735
[148] Yang I V, Thorp H H. *Anal. Chim*. 2001, **72**: 5316
[149] Elena E E, Dominguez E. *Electroanal*. 2003, **15**: 629
[150] Kerman K, Morita Y, Takamura Y et al. *Electrochem. Commun*. 2003, **5**: 887
[151] 赵洪桃，张志洁，鞠熀先. 科学通报. 2005, **50**: 1539
[152] Lee T Y, Shim Y B. *Anal. Chem*. 2001, **73**: 5629
[153] Thompson L A, Kowalik J, Josowicz M et al. *J. Am. Chem. Soc*. 2003, **125**: 324
[154] Kelly S O, Boon E M, Barton J K et al. *Nucleic Acids Res*. 1999, **27**: 4830
[155] Boon E M, Ceres D M, Drummond T G et al. *Nat. Biotechnol*. 2000, **18**: 1096
[156] Holmlin R E, Dandliker P J, Barton J K. *Angew Chem. Int. Ed*. 1997, **36**: 2714
[157] Kelly S O, Barton J K. *Science*. 1999, **283**: 375
[158] Ganesh K N, Nielsen P E. *Curr. Org. Chem*. 2000, **4**: 931
[159] 马立人，蒋中华.生物芯片. 第 2 版. 北京:化学工业出版社，2002
[160] 丁金凤，杨渝珍，张先恩.基因分析和生物芯片技术. 武汉:湖北科学技术出版社，2004
[161] 魏芳，赵新生. 大学化学. 2003, **18**: 1
[162] Schena M. *Microarray Analysis*. New York: John Wiley & Sons Inc. 2003
[163] Schena M, Shalon D, Davis R W. *Science*. 1995, **270**: 467
[164] Hacia J G, Woski S A, Fidanza J. *Nucleic Acids Res*. 1998, **26**: 4975
[165] Guo Z, Guilfoyle R A, Thiel A J. *Nucleic Acids Res*. 1994, **22**: 5456
[166] Behr M A, Wilson M A, Gill W P. *Science*. 1999, **284**: 1520
[167] Drmanac S, Kita D, Labat I. *Nat Biotechnol*. 1998, **16**: 54
[168] Hacia J G, Brody L C, Chee M S. *Nat. Genet*. 1996, **14**: 441
[169] Shalon D, Smith S J, Brown P O. *Genome Res*. 1996, **6**: 639
[170] Malanie T H, Susan E C, Micheal M. *Cancer Res*. 2001, **61**: 2320
[171] DeRisi J, Penland L, Brown P O. *Nat. Genet*. 1996, **14**: 457
[172] Khan J, Simon R, Bittner M. *Cancer Res*. 1998, **8**: 5009
[173] Heiskanen M, Kononen J, Barlund M. *Anal. Cell Pathol*. 2001, **22**: 229
[174] Moch H, Schraml P, Bubendorf L. *Am. J. Pathol*. 1999, **154**: 981
[175] Charles M P, Therese S, Michael B E. *Nature*. 2002, **406**: 747
[176] Francois B, Valery N, Samuel G. *Hum. Mol. Genet*. 2002, **11**: 863
[177] Chen C C, Shieh B, Jin Y T. *J. Biomed. Sci*. 2001, **8**: 214
[178] Heller R A, Schena M, Chai A. *Proc. Nat. Acad Sci*. 1997, **94**: 2150
[179] Ichikawa J K, Norris A, Bangera M G et al. *Proc. Nat. Acad Sci USA*. 2000, **97**(**17**): 9659
[180] 陈永青，黄达蔷，乐军. 中国科学(C 辑). 2003, **33**: 231

[181] Grifantini R, Bartolini E, Muzzi A. *Nat. Biotechnol.* 2002, **20**: 914
[182] Mahony J B. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2002, **975**: 192
[183] Dietrich G, Kurz S, Hubner C. *J. Bacteriol.* 2003, **185**: 155
[184] Ampe F, Kiss E, Sabourdy F. *Genome Biol.* 2003, **4**: 15
[185] Bohn E, Muller S, Lauber J. *Cell Mierobiol.* 2004, **6**: 129
[186] Li J, Chen S, Evans D H. J. *Clin. Microbiol.* 2001, **39**: 696
[187] Park T C, Kim C J, Koh Y M. *DNA Cell Biol.* 2004, **23**: 119

第 9 章　核酸扩增和序列分析

核酸是各种生物体内最基本的分子之一。核酸包括脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid,DNA)和核糖核酸(ribonucleic acid,RNA)。核酸不仅是生物体内遗传信息储存、复制和传递的主要物质基础,在蛋白质的生物合成上也占有重要位置,对生长、遗传、变异等重大生命现象起着决定性的作用。核酸的结构可以说是“既简单又复杂”。核酸的组成十分简单,由 4 种单核苷酸(A、G、C、T 或 A、G、C、U)组成。但是由于核酸的分子巨大,4 种核苷酸的排列组合千变万化,加之核酸在空间位置上有多种变化,由此在简单的组成中形成复杂的序列结构,执行多样的生物学功能。

核酸的生物学功能发挥与其序列结构密切相关。核酸序列结构上的微小变化,如一个单核苷酸的变化甚至仅仅是核酸空间构象的变化,都可能影响核酸的功能,继而影响遗传信息的传递和生物体的各种生命活动。因此,核酸序列的精确测定和分析是研究核酸功能的重要基础,为临床基因诊断、新药研发、基因工程和法医学等提供了有用信息。

但是,核酸的序列分析并不可能一步完成,因为生物体内成分复杂,必须要先用一系列方法去掉其他成分干扰而将核酸提取和分离出来。而提取出的核酸由于含量极微,有时不能直接用于分析,需要利用体外核酸扩增技术——聚合酶链反应方法将核酸在体外扩增数百万倍,在满足后续研究的含量要求后,再进行序列分析。因此,核酸的提取和分离、体外扩增和测序是研究核酸结构和功能的重要手段。

9.1　核酸的提取和分离

在与核酸相关的研究中,进行序列分析常用的核酸是染色体 DNA、质粒 DNA 和信使 RNA(mRNA),这类核酸的提取和分离的方法很多,原理各有不同,也各有其特点。在选择方法时,应根据待分离核酸的性质与研究目的选择不同的方法。虽然核酸的提取和分离的方法多种多样,但总的来说,大都是由以下 3 个步骤组成:

(1) 细胞裂解:由于绝大部分 DNA 和 RNA 一般位于细胞内,核酸提取的第一步就是要裂解细胞,使核酸从细胞内释放出来。常用的方法是低渗溶液或表面活性剂(如 SDS 或 Triton X-100 等)裂解细胞。也可用具有细胞裂解活性的酶类

物质(如溶菌酶等)处理细胞,破坏细胞膜,释放细胞内容物。内容物中也包括待分离的核酸。

(2) 核酸的分离和纯化:细胞裂解物是含有核酸的复杂样品,包括细胞碎片、蛋白质等干扰核酸提取的成分,且核酸分子易与蛋白质形成核蛋白复合物,因此需要使用化学或物理方法破坏核酸-蛋白质复合物,除去细胞碎片以及其他的非核酸成分,并从复杂的细胞裂解物样品中提取出所需要的核酸分子。该步骤常用的方法有空间排阻层析、液-液层析、氯化铯(CsCl)密度梯度离心和蛋白水解酶消化等。

(3) 核酸的浓缩与扩增:核酸分离和纯化过程会造成核酸的丢失,引起样品中核酸含量降低,需要对核酸进行浓缩和扩增,以增加核酸含量满足后续研究的要求。核酸浓缩常常使用有机溶剂沉淀法,利用有机溶剂屏蔽核酸分子上带负电的磷酸基团,以达到浓缩核酸的目的。核酸含量过于微量时,则需要使用 PCR 进行体外核酸扩增(详见 PCR 相关内容)。

在核酸的分离提取中,应遵循如下原则:

(1) 尽可能保持核酸结构的完整性。因为在分离提取过程中会进行物理处理或加入化学试剂,这些因素对核酸分子有破坏作用,因此,必须控制反应条件,使损伤作用降到最低。

(2) 尽量排除其他物质的污染,保证核酸的纯度。尽可能除去细胞内其他非核酸的大分子和非必需的核酸分子,以及在分离过程中加入的对后续实验有影响的溶液与试剂的干扰,最终得到纯度尽可能高的核酸样品。非核酸的大分子主要包括蛋白质、多糖和脂类物质等;非必需的核酸分子是指在分离 DNA 时,RNA 就为干扰物,反之亦然;至于在分离过程中加入的溶液与试剂,由于会对后续实验造成干扰,往往也需要很好地去除。

9.1.1 氯化铯密度梯度离心

氯化铯密度梯度离心是分离核酸样品的较好方法。重金属盐氯化铯(CsCl)可以说是目前使用的最好的密度梯度离心介质,它在离心场中可自行调节形成浓度梯度,并能保持稳定。在氯化铯形成的密度梯度中,离心管顶部的密度为 1.60 $g \cdot ml^{-1}$,底部为 1.80 $g \cdot ml^{-1}$。

CsCl 密度梯度离心的分离原理是:DNA 因浮力密度与 RNA 及蛋白质不同,在 CsCl 密度梯度离心时得以分离。同理也可对 RNA 进行分离。在进行 CsCl 密度梯度离心时,RNA 因浮力密度较高而沉降在管底,蛋白质的浮力密度相对较低,浮在管顶部,而 DNA 的浮力密度约为 1.70 $g \cdot ml^{-1}$,故主要集中在离心管中部的区域,三种物质各自在 CsCl 介质中形成稳定的区带而得以分离(图 9.1)。

CsCl 密度梯度离心除了可以将 DNA 与 RNA 进行分离,在加入溴化乙锭(EB)后,还可用于分离质粒 DNA 与染色体 DNA。溴化乙锭是一种荧光染料,经

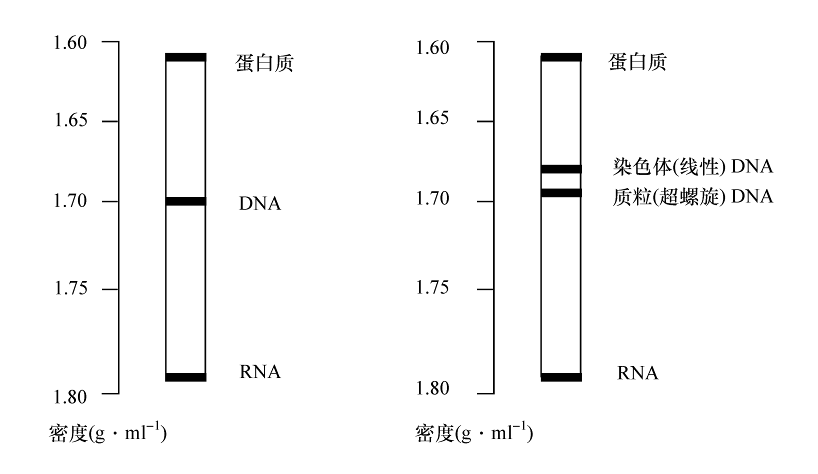


图 9.1　CsCl 密度梯度离心分离核酸的示意图

紫外线照射可发出荧光，也用于检测 PCR 电泳的产物。溴化乙锭可嵌合在双链 DNA 分子内部，由于它的结合，可使双螺旋结构的 DNA 分子的浮力密度减小。染色体 DNA 是线性结构，质粒 DNA 具有超螺旋结构，溴化乙锭更容易与线性的染色体 DNA 结合，因此染色体 DNA 可结合更多的溴化乙锭，使其浮力密度比质粒 DNA 减小得更多(染色体 DNA 浮力密度减小 0.125g · ml^{-1}，质粒 DNA 浮力密度减小 0.085 g · ml^{-1})，由此两者的浮力密度呈现差异，离心后在紫外线照射下可见两条区带。用注射器或吸管分别吸取两条带内的物质，上下两条带内物质分别为染色体 DNA 和质粒 DNA(图 9.1)。

9.1.2　总细胞 DNA 分离

在 DNA 提取过程中应做到：①根据不同研究需要，保证结构的相应完整性；②尽量排除其他大分子成分的污染(蛋白质、多糖及 RNA 等)；③保证提取样品中不含对酶有抑制作用的有机溶剂及高浓度的金属离子。

在进行细胞内总 DNA 分离时，首先应将细胞或组织样品置于特殊的缓冲液中，该缓冲液含有去垢剂 SDS 或 Triton X-100，可利用去垢剂破坏细胞，使细胞内部的 DNA-蛋白质复合物释放出来。但是在这个过程中细胞内部的 RNA 和蛋白质分子同样也会被释放出来，为了去除 RNA 的干扰，可在缓冲液中加入核糖核酸酶(RNA 酶)降解 RNA，而蛋白质的干扰则可以用蛋白水解酶(常用蛋白酶 K)来消化蛋白质。随后在反应体系中加入乙醇，利用乙醇屏蔽 DNA 分子中带负电荷的磷酸基团，降低 DNA 分子的溶解度，将混合物中的长链 DNA 离心沉淀，得到 DNA。要注意的是，以上方法只能分离长链 DNA，而短链 DNA、寡核苷酸、单核苷酸等仍然保留在上清液中。

9.1.3　细胞 RNA 分离

完整 RNA 的提取和纯化，是进行 RNA 方面的研究工作，如 Nothern 杂交、mRNA 分离、RT-PCR、定量 PCR、cDNA 合成及体外翻译等的前提。所有 RNA 的提取过程中都有 5 个关键点：①样品细胞或组织的有效破碎；②有效地使核蛋白复合体变性；③对内源 RNA 酶的有效抑制；④有效地将 RNA 从 DNA 和蛋白质的混合物中分离；⑤多糖含量高的样品牵涉到多糖杂质的有效去除。

实验失败的主要原因是 RNA 酶的污染。由于 RNA 酶具有自然界中广泛存在、一般反应不需要辅助因子参与、较稳定（RNA 酶可耐受多种处理而不被灭活，如煮沸、高压灭菌等）的特点，因而只要存在少量的 RNA 酶就会引起 RNA 在分离提取过程中的降解，而所制备的 RNA 的纯度和完整性又直接影响 RNA 分析的结果，同时 RNA 和蛋白质结合非常紧密，所以 RNA 的分离提取操作比 DNA 的分离提取操作难度要大。

在实验中，一方面要严格控制外源性 RNA 酶的污染，另一方面要最大限度地抑制内源性 RNA 酶。空气尘埃、操作人员的手汗、唾液等都存在外源性 RNA 酶。在其他分子生物学实验中使用的 RNA 酶也属于外源性 RNA 酶，这些外源性 RNA 酶可污染器械、玻璃制品、塑料制品、电泳槽及各种试剂。而各种组织和细胞中则含有大量内源性 RNA 酶。

为了防止外源性 RNA 酶污染和抑制内源性 RNA 酶活性，可以采取以下措施：①所有的玻璃器皿均应在使用前于 180 ℃的高温下干烤 6 h 以上；②塑料器皿在使用前可用 0.1％焦磷酸二乙酯（DEPC）水溶液浸泡或用氯仿冲洗；③配制的溶液应尽可能的用 0.1％ DEPC 在 37 ℃处理 12 h 以上，然后用高压灭菌除去残留的 DEPC；④不能高压灭菌的试剂，应当用 DEPC 处理过的无菌双蒸水配制，然后经 0.22 μm 滤膜过滤除菌；⑤操作人员戴一次性口罩、帽子、手套，实验过程中手套要勤换；⑥设置 RNA 操作专用实验室，所有器械等应为专用；⑦使用 RNA 酶抑制剂，如 DEPC、异硫氰酸胍、氧钒核糖核苷复合物、RNA 酶的蛋白抑制剂（RNasin）、SDS、尿素、硅藻土等。

RNA 分离中最常用的方法是蛋白酶 K 法。其基本过程是：先将细胞在低渗溶液中孵育，裂解细胞，释放细胞中的物质包括 RNA 和其他干扰物，随即通过离心沉淀的方法去除 DNA 和细胞碎片。上清液用蛋白酶 K 消化，破坏 RNA 和核蛋白之间的结合，以释放更多的 RNA。用酚/氯仿抽提 RNA，使 RNA 存在于水相中，最后利用乙醇沉淀水相中的 RNA，加适量无 RNA 酶的水或缓冲液溶解即可。

9.2　核酸的体外扩增——聚合酶链反应

聚合酶链反应（PCR）实质是一种体外的酶促合成反应。它利用 DNA 聚合酶

的催化活性,在体外扩增特异性的核酸序列,实现对核酸在体外的复制。1985 年,PCR 技术由美国分子生物学家 Kary Mullis 及其同事发明。1986 年,PCR 技术在冷泉港实验室举行的定量化学专题研讨会上被首次公开[1]。1988 年,该项技术正式商品化。发明人 Kary Mulli 于 1993 年荣获诺贝尔化学奖。

PCR 技术有两个重要的特点:首先是具有很高的灵敏度,可以实现对极微量核酸的扩增和分析,在理论上只要存在一个核酸分子,就可以对其进行扩增和分析;其次是 PCR 技术具有一定的特异性,即扩增的范围仅包括引物所覆盖的特定基因序列。

PCR 技术作为一种强有力的体外核酸扩增技术,给现代生物化学带来了深刻的变革,也对基因诊断和临床医学诊断产生了深刻的影响。由于 DNA 样本的含量较少,不能直接用于测序和分析,这在 PCR 技术发明之前一直是困扰核酸相关研究的问题之一。随着 PCR 技术的发明、发展和完善,这些问题都迎刃而解。在法医学鉴定中使用 PCR 技术,只需要一根毛发或一点唾液就足以进行鉴定和分析,发现破解案件的蛛丝马迹。在临床医学中,则可以使用 PCR 技术进行传染病(如结核、病毒性肝炎等)的快速诊断,大大地缩短了疾病诊断的时间。利用 PCR 技术,可对不同物种和不同人群中各个个体的基因变化或变异进行分析。可以说,PCR 技术是分子生物学中核酸相关研究的重要基础。正因为 PCR 技术的应用领域非常广泛,所以被列为 20 世纪 90 年代“生物学十大热点之首”。

9.2.1　PCR 的原理

PCR 技术的基本原理类似于 DNA 的天然复制过程,包括核酸的变性(denaturation)、复性(annealing)和延伸(extension)三步。这种复制实际上是在体外试管中进行的,只是在试管中必须给 DNA 的体外合成提供合适的成分及条件,因此 PCR 也被称为“试管中的扩增反应”。PCR 反应成分包括:起延伸起点作用的过量的扩增用引物(引物是指能与待扩增区域末端互补结合的寡核苷酸链);起催化合成作用的 DNA 聚合酶;起合成原料作用的过量的 4 种脱氧核苷三磷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP);模板 DNA,即扩增用 DNA 样本;反应缓冲液,用以维持适宜的反应 pH,并提供反应必需的离子(如 Mg^{2+} 等)。

PCR 反应是重复进行 DNA 复制的过程,每一次复制包括 3 个控制温度的步骤,即变性、复性、延伸,也就是所谓的 PCR 原理“三步曲”(图 9.2)。

变性:通过加热使反应体系温度升至 94～95 ℃。变性的主要目的是在高温下破坏模板双链 DNA 之间的氢键,从而使双链 DNA 解链为单链 DNA,以便模板与引物结合,为复性和延伸反应做准备。

复性:将温度降至 50～60 ℃左右。在此温度下,反应体系中的单链 DNA 可以重新形成氢键,并通过碱基互补原则再次形成为双链 DNA。但由于反应体系中

存在大量的 PCR 引物(约 10^{10}～10^{11} 个分子),比模板的数量要多很多,且引物长度较短,所以在相同的复性温度下更容易与单链 DNA 紧密结合。因此,在复性阶段,10～30 个碱基的引物序列与模板 DNA 3′端互补结合,形成局部双链,而由 DNA 单链模板相互复性重新形成的完整双链数量则非常少。

延伸:在复性阶段,引物与单链模板 DNA 3′端互补结合形成的只是局部双链,需要在延伸过程中将其合成为一条完整的双链。合成完整的双链需要 DNA 聚合酶的催化。具体来说是以引物 3′为起点,DNA 聚合酶按照模板链的序列,以碱基互补配对的原则,依次把 dNTP 加至引物的 3′端,使局部 DNA 双链不断延伸,最终形成新的完整的 DNA 双链。一般来说,延伸温度为 72℃。在此温度下,DNA 聚合酶的保真性和合成效率都能同时得到最大限度的保证。

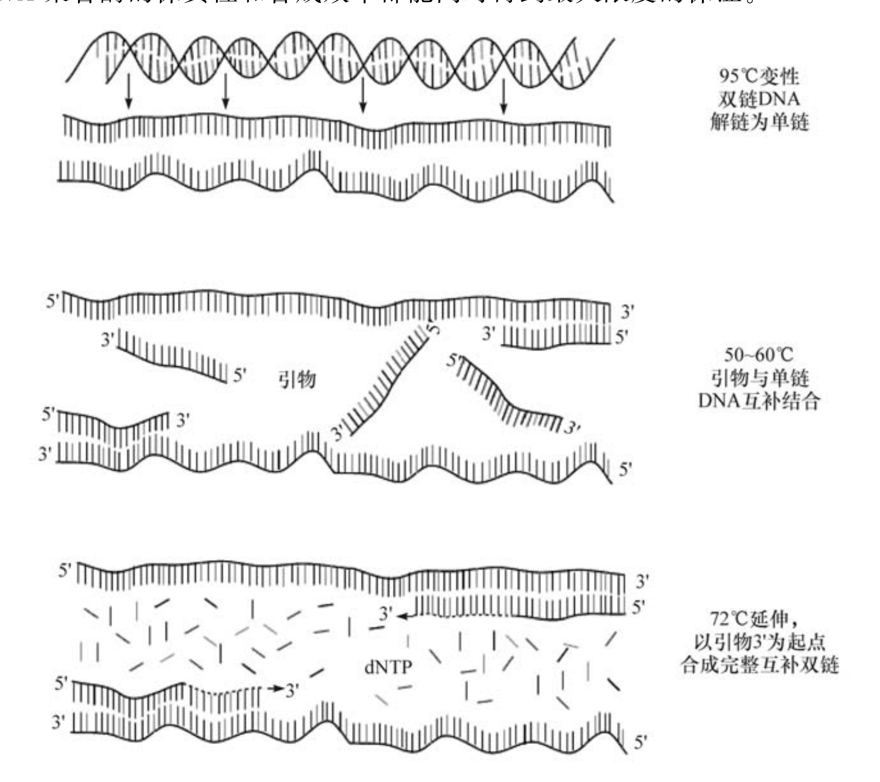


图 9.2　PCR 原理示意图

变性-复性-延伸三个步骤即组成了 PCR 的一个循环,一般 PCR 有 20～35 个循环。PCR 的循环过程实质上就是重复的升温和降温的反应过程,因此也被称为热循环每完成一个循环需 2～4 min,2～3 h 就能将目的基因的数目扩增放大几百万倍。

9.2.2　PCR 的扩增效率

理论上来说,在 PCR 的每一个循环后,DNA 的拷贝数都会加倍(图 9.3),即反应体系中的双链 DNA 的数量是循环前的 2 倍,也就是所谓的“指数扩增”。那么,在 PCR 的所有循环都结束后,理论上可得到的 DNA 拷贝数(N_m)与起始模板拷贝数(N_0)以及循环数(n)之间的关系可以用以下公式计算:

$$N_m = N_0 2^n \tag{9.1}$$

但是,由于受到 PCR 反应体系中各成分的消耗和逐渐增多的双链 DNA 等各种抑制因素的影响,实际的 PCR 扩增反应无法在整个扩增过程中始终保持“指数扩增”。因此,在实际情况下可得到的 DNA 拷贝数(N_m)与起始模板拷贝数(N_0)以及循环数(n)之间的关系应用以下公式计算:

$$N_m = N_0(1 + x)^n \tag{9.2}$$

式中,x 表示反应效率,反应效率的数值在 0～1 之间(只有当反应效率 x 为 1 时,才是真正的指数扩增)。当起始模板 DNA 为 1($N_0=1$),进行 20 个反应循环($n=20$)时,在理论情况下(反应效率 $x=1$)反应最终所得 DNA 数超过 100 万;而当反应效率为 0.7($x=0.7$)时,反应最终所得 DNA 数仅 4 万。由此比较可见,实际的扩增数和理论上应得的 DNA 分子数会有较大差异。

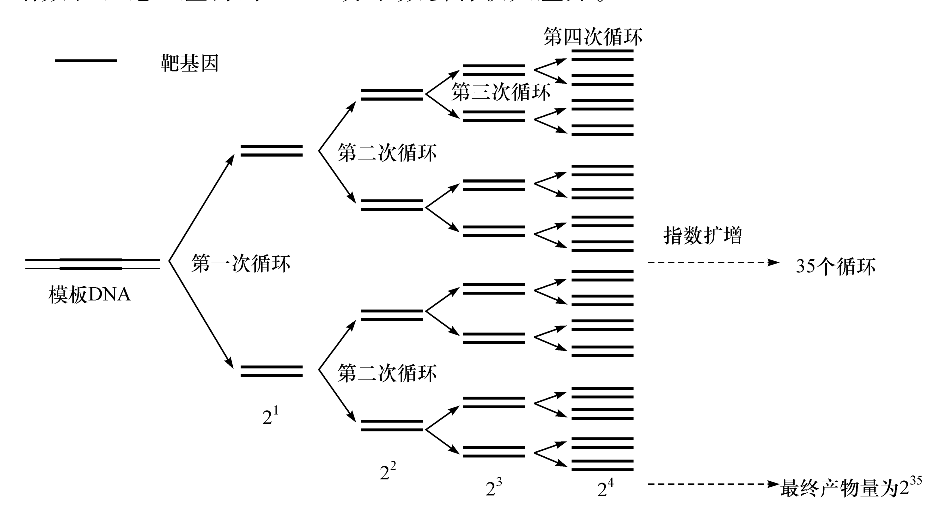


图 9.3　PCR“指数扩增”示意图

理论上 PCR 是一个指数增长的过程,但是实际的 PCR 扩增并非理论上那样,因此 PCR 的扩增曲线也并不是标准的指数曲线,而是 S 形曲线(图 9.4)。可以将这个 S 形曲线分为 3 个时期:基准期、指数增长期和平台期。

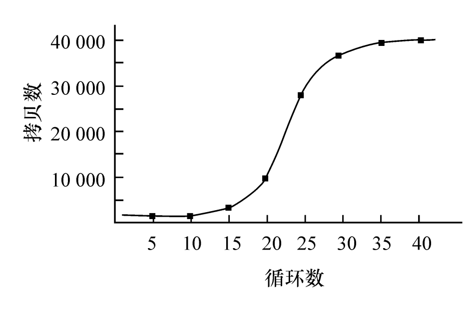


图 9.4　PCR 的扩增速率曲线(S 形曲线)

基准期:一般位于 1～15 个 PCR 反应周期,该阶段 PCR 产物的增加处于缓慢状态。这是因为此时反应体系内的模板含量较少,PCR 处于一个准备阶段。

指数增长期:一般位于 15～25 个 PCR 反应周期,该阶段 PCR 产物的增加与循环数呈线性关系。此时 PCR 的扩增速率最高,PCR 产物增加最为明显。

平台期:一般位于 25 个循环以后,PCR 产物的增加又变得很缓慢,再继续进行热循环也不能使 PCR 产物有显著的增加。其原因有:①PCR 反应试剂的消耗(如 dNTP、引物的逐渐减少等);②在多次的热循环反应中 DNA 聚合酶活性降低;③反应释放的磷酸盐抑制 DNA 聚合酶活性;④在反应中双链产物逐渐增多,在复性过程中自身再形成双链,逐渐抑制引物与单链模板的复性。因此,在该时期,PCR 产物增长进入一个缓慢的平台期,即使再增加反应循环数也不能明显增加反应产量。而且由于 DNA 聚合酶活性降低,此期的非特异性扩增和错误扩增产物也明显增多。

反应扩增效率并不是衡量 PCR 有效性的唯一指标,其衡量指标还包括特异性(specificity)和保真性(fidelity)。所谓特异性是指 PCR 反应只扩增目的核酸序列,而不扩增其他非特异性的核酸序列。而保真性是指在 PCR 延伸过程中碱基的错配概率。错配概率越低,保真性越高,保真性主要与 DNA 聚合酶的质量有关。因此,理想的 PCR 反应应该同时具有高反应效率和高产量、高特异性以及高保真性。

9.2.3　PCR 的试剂和反应条件选择

PCR 反应所需要的试剂,除了 DNA 模板以外,还需要 DNA 聚合酶、一对合适长度的 PCR 引物和 4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP)。为了保证 PCR 顺利进行,还必须要严格控制反应环境条件(pH、离子强度等),这就需要在反应中加入合适的缓冲液。必要时还可以加入其他合适的添加试剂,以保证 PCR 反应得到特异、高效的扩增。

1. 模板核酸(靶基因)

模板核酸的含量与纯度是 PCR 反应成败与否的关键环节之一。传统的 DNA 分离纯化方法通常采用 SDS 和蛋白酶 K 来消化处理标本。SDS 的主要作用是溶解细胞膜上的脂类与蛋白质,从而破坏细胞膜,并解离细胞中的核蛋白。SDS 还能与蛋白质结合而沉淀。蛋白酶 K 能水解消化蛋白质,特别是与 DNA 结合的组

蛋白。再用有机溶剂酚与氯仿抽提掉蛋白质和其他细胞组分，用乙醇或异丙醇沉淀核酸，提取的核酸即可作为模板用于 PCR 反应。一般临床检测标本，可采用快速简便的方法溶解细胞，裂解病原体，消化除去染色体的蛋白质，使靶基因游离，直接用于 PCR 扩增。RNA 模板提取一般采用异硫氰酸胍法或蛋白酶 K 法，同时要防止核糖核酸酶降解 RNA。

2. DNA 聚合酶

DNA 聚合酶(DNA polymerase)是进行 PCR 反应的关键因素之一，其作用是催化合成与模板互补的 DNA 双链，即在模板指导下，以 dNTP 为原料，在引物的 3′端加上脱氧单核苷酸，形成 3′,5′-磷酸二酯键，使 DNA 链沿着 5′→3′方向延伸。

PCR 技术发明初期，所使用的聚合酶是不耐热 DNA 聚合酶(在高温下不稳定)，在变性温度下会降解而使活性完全丧失。因此，当时进行每一个 PCR 循环后，都必须要加入新的 DNA 聚合酶以补充降解的部分，保证扩增的顺利进行，这也给 PCR 的实际应用带来了极大的不便。

热稳定 DNA 聚合酶(如 Taq DNA 聚合酶，来源于水生嗜热杆菌)的出现解决了这一关键问题，因为它耐高温，在变性温度 94 ℃处理 2h 仍可保持 40%的活性，不必每次循环后都补充新的酶。除了 Taq DNA 聚合酶，目前还发现了比 Taq DNA 聚合酶性能更好的聚合酶，如 Tth 聚合酶、Pwo 聚合酶和 Pfu 聚合酶等，这些聚合酶不仅具有热稳定性，而且还都具有优良的聚合特性，可以用于扩增长链 DNA。尤其是 Pwo 聚合酶和 Pfu 聚合酶还具有校正读码活性，即 3′→5′核酸外切酶活性，当聚合酶催化聚合反应发生碱基错配时，聚合酶的校正读码活性可将错配的碱基切除。由于 3′→ 5′核酸外切酶活性的存在，大大地提高了 PCR 的保真性(或称忠实性)，在扩增长链 DNA 时尤其具有优越性。

3. 引物

引物(primer)是一段短的寡核苷酸链，长约 15～30 个核苷酸，可与待扩增 DNA 片段的末端互补结合。通常每扩增一个目的 DNA 片段，使用一对引物，即相应上游引物(forward primer)和下游引物(reverse primer)。它们分别与解链后的两条 DNA 单链 3′端结合，以引物的 3′端为起点，将一个脱氧核苷三磷酸加在引物 3′端的羟基上，进行 PCR 延伸反应，引物的 5′端不具有延伸功能。

PCR 中的引物浓度一般在 0.1～0.2 μmol · L^{-1}，浓度过高容易形成引物二聚体或非特异性产物。引物是 PCR 特异性反应的关键因素，PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 互补的程度。

理论上，只要知道任何一段模板 DNA 序列，就能根据互补的寡核苷酸链设计引物，然后利用 PCR 就可将模板 DNA 在体外大量扩增。引物设计与 PCR 的反应

效果有十分密切的关系，进行引物设计应遵循以下基本原则：①引物长度一般在10～30个核苷酸为宜，两条引物的长度最好一致，并且只和模板的正负链结合；②引物内部和两条引物间不要有互补的序列（尤其避免3′端互补），以免形成链内发夹结构和引物二聚体；③引物的碱基组成要均衡，避免出现嘌呤或嘧啶堆积，一般引物序列中（G＋C）含量为40％～60％；④两条引物应具有相近的 T_m 值（一般在55～80 ℃）；⑤引物3′端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应严格要求配对，以避免因末端碱基不配对而导致PCR失败；⑥引物确定以后，可以对引物进行必要的修饰，例如在引物的5′端加酶切位点序列，但3′端绝对不能进行任何修饰，因为引物的延伸是从3′端开始的；⑦标记生物素、荧光素、地高辛等，这对扩增的特异性影响不大。当然，对引物的要求不仅只有以上几条，因此人工进行引物设计是一个烦琐的过程，目前多使用引物设计软件（表9.1）进行引物设计，优化设计参数，选择最佳引物。

表 9.1　常用引物设计软件

软件名	简介
Primer Premier	序列分析与引物设计软件，用于PCR或测序引物以及杂交探针的设计和评估。http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html
Oligo	引物分析著名软件，主要应用于核酸序列引物分析设计，同时计算核酸序列的杂交温度（T_m）和理论预测序列二级结构。http://www.oligo.net/
Primer 3	比较有名的在线引物设计程序。http://www.genome.wwi.mit.edu/cgi-bin/primer/info.cgi/
PrimerDesign	ftp://ftp.chemie.uni-marburg.de/pub/PrimerDesign/
Primer-Master	http://www.ebi.ac.uk/pub/software/

4. 脱氧核苷三磷酸（dNTP）

4种脱氧核苷三磷酸（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）可称为是PCR合成的原料。由于dNTP在反应中要不断消耗，须加入过量的原料。但是其浓度也不可过高，dNTP的浓度一般为20～200 $\mu mol \cdot L^{-1}$。浓度过高能加快反应速率，但也增加了非特异性扩增的概率，DNA聚合酶复制DNA时容易出错。降低dNTP的浓度可以相应提高反应特异性。同时要注意的是，必须保证4种脱氧核苷三磷酸的浓度一致，否则会增加聚合酶的错配概率。

5. 缓冲液

DNA聚合酶作用的发挥，还必须有合适的pH和离子强度，其中离子强度对于PCR反应的特异性十分重要。一般来讲离子强度与特异性呈反比。PCR反应

的缓冲液(buffer)是为了为 Taq DNA 聚合酶提供一个最适酶促催化反应条件。常用的 PCR 缓冲液是 50 mmol · L^{-1} 的 Tris-HCl,缓冲液中还含有 50 mmol · L^{-1} 的 KCl 或 NaCl,其 pH 在室温时为 8.3,在 72℃时为 7.2。

在 PCR 反应体系中,还需要加入终浓度为 0.5～5 mmol · L^{-1} 的 $MgCl_2$。Mg^{2+} 在 PCR 中具有重要的作用:①影响 DNA 聚合酶的活性。它可以与 DNA 和聚合酶形成复合物,使 DNA 和聚合酶之间的距离更近,并且可以中和 DNA 分子中的阴离子基团,对 DNA 聚合酶有激活作用,影响产量。②影响引物复性,从而影响 PCR 特异性。因此合适的 Mg^{2+} 浓度对于保证 PCR 反应的特异性和保真性都十分重要。最佳的 Mg^{2+} 浓度对于不同的引物和模板都不同,但是在包含 200 μmol · L^{-1} dNTP 的典型 PCR 反应中 Mg^{2+} 起始浓度是 1.5 mmol · L^{-1}。为了确定最佳 Mg^{2+} 浓度,可从 1 mmol · L^{-1} 到 3 mmol · L^{-1},以 0.5 mmol · L^{-1} 递增,来确定最佳 Mg^{2+} 浓度。

PCR 体系中还可加入一些添加物,以稳定和保护聚合酶或提高引物与模板的复性效果。这些物质包括甘油、小牛血清白蛋白(BSA)和聚乙二醇(PEG)。如果要提高和优化变性效果,则可加入二甲亚砜(DMSO)、甲酰胺或表面活性剂,如 Tween-20 等。添加物对增强高(G+C)含量模板的特异性和产量较为有效,它们的机制可能是降低溶解温度,以助于引物复性并辅助 DNA 聚合酶延伸。具体要添加何种物质,主要与使用的聚合酶的性质和特定的模板有关。

6. PCR 条件的选择

PCR 条件主要是指反应温度、时间和循环次数。

基于 PCR 原理,设置变性-复性-延伸 3 个温度点。标准反应一般采用 3 温度点法,使双链 DNA 在 90～95 ℃变性,再迅速冷却至 40～60 ℃,引物经复性结合到靶序列上,然后快速升温至 70～75 ℃,在 Taq DNA 聚合酶的作用下,使引物链沿模板延伸。对于较短靶基因(长度为 100～300bp 时)可采用二温度点法,除变性温度外,复性与延伸温度可合二为一。一般采用 94 ℃变性,65 ℃左右复性与延伸(此温度 Taq DNA 酶仍有较高的催化活性)。

变性温度与时间:变性温度低,解链不完全是导致 PCR 失败的原因之一。一般情况下,在 93～94 ℃历时 1 min 足以使模板 DNA 变性,若低于 93 ℃则需延长时间。此步若不能使靶基因模板或 PCR 产物完全变性,就会导致 PCR 失败。因为高温环境对酶的活性有影响,变性温度不易过高。

复性温度与时间:复性温度对 PCR 特异性影响较大。复性的温度与时间取决于引物的长度、碱基组成及其浓度,还有靶基因序列的长度。对于 20 个核苷酸,(G+C)含量约 50%的引物,55 ℃为较理想的复性温度。复性温度的选择与 T_m 值密切相关。所谓 T_m 值是一定盐浓度条件下,50%寡核苷酸双链解链的温度。

应先确定 T_m 值,再根据 T_m 值选择复性温度。

对小于 20bp 长度引物,

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \tag{9.3}$$

对大于 20bp 长度引物,

$$T_m = 81.5 + 0.41 \times GC\% - 600/L \tag{9.4}$$

式中,L 代表引物碱基数;GC% 代表引物(G+C)含量。在 PCR 反应过程中选择复性温度时,一般为

$$复性温度 = T_m - (5 \sim 10℃) \tag{9.5}$$

在 T_m 值允许范围内,选择较高的复性温度可减少引物和模板间的非特异性结合,提高 PCR 反应的特异性;反之则降低反应的特异性,但可提高扩增反应阳性结果的机会。复性时间一般为 30～60 s,足以使引物与模板完全结合。

PCR 反应的延伸温度一般选择在 70～75 ℃,常用温度为 72 ℃,延伸温度过高不利于引物与模板的结合。PCR 延伸反应的时间,可根据待扩增片段的长度而定,通常 1kb 以内的 DNA 片段,延伸时间为 1～2 min 已足够。3～4 kb 的靶序列需 3～4 min;扩增 10kb 需延伸至 15 min。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现。对低浓度模板的扩增,延伸时间应适当延长。

模板 DNA 含量和循环次数决定了 PCR 扩增的产量,因此 PCR 循环次数应依据模板 DNA 的起始含量而定,一般的循环次数选在 30～40 次之间。随着循环次数增加,非特异性产物的量也随之增多。

9.2.4 PCR 常见问题以及解决办法

在进行 PCR 反应时,有时会遇到一些问题,需要及时调整 PCR 设置参数及条件,改善扩增效率和扩增的特异性。

1. 无扩增产物

阳性对照出现条带,而样品中则没有预期的 PCR 产物出现。这是 PCR 反应常见的问题之一。其常见原因和处理措施见表 9.2。

表 9.2 PCR 无预期扩增产物的原因分析及对策

原因	对策
模板含有抑制物或含量过低	纯化模板,加大模板用量
缓冲液对样品不适合	更换缓冲液或调整浓度
引物设计不当发生降解	重新设计引物(避免链间二聚体和链内二聚体)
复性温度太高,延伸时间太短	降低复性温度,延长延伸时间

2. 非特异性扩增

非特异性扩增指 PCR 扩增后出现的条带与预期结果不一致，或大或小，或者特异性扩增带与非特异性扩增带同时出现，可以按照表 9.3 进行分析和改进。

表 9.3　非特异性扩增的原因分析及对策

原因	对策	原因	对策
引物浓度过高	0.1 μmol · L^{-1}间隔递减	复性温度过低	2 ℃间隔递增
引物设计不合理	重新设计引物	延伸时间过短	1 min 间隔递增
酶量过多	0.5 U 间隔递减	模板量过多	模板量 20%间隔递减
循环次数过多	两个循环间隔递减		

另外还有几种可以提高 PCR 特异性的方法，包括：

(1) 热启动(hot start)PCR：是一种能够提高 PCR 特异性的成熟和简便的方法。尽管 Taq DNA 聚合酶的最佳延伸温度在 72℃，但聚合酶在室温仍然有活性。因此，在进行 PCR 反应配制过程中，以及在热循环刚开始，即保温温度低于复性温度时会产生非特异性的产物。这些非特异性产物一旦形成，就会被有效扩增。热启动 PCR 对于抑制这类非特异性扩增尤为有效。

限制 Taq DNA 聚合酶活性的常用方法是在冰上配制 PCR 反应液，并将其置于预热的 PCR 仪。这种方法简单便宜，但并不能完全抑制酶的活性，因此并不能完全消除非特异性产物的扩增。

热启动是通过抑制一种 PCR 的基本成分延迟 DNA 合成，直到 PCR 仪达到变性温度。如使用蜡防护层将一种基本成分(如镁离子或酶)包裹起来，或者将反应成分(如模板和缓冲液)物理地隔离开。在热循环时，因蜡熔化而可把各种成分释放出来并使它们混合在一起。另外也可采用延缓加入 Taq DNA 聚合酶的方法。这些方法都比较烦琐，易于污染，不适高通量应用。

目前通用的热启动技术是抗体介导的抑制 DNA 聚合酶法或化学修饰 DNA 聚合酶法。抗体介导的抑制 DNA 聚合酶法在反应体系中加入 DNA 聚合酶的单克隆抗体，以至于在室温时延持保温过程中抗体抑制酶的活性。在 94℃保温变性过程中，DNA 聚合酶单克隆抗体永久失活，使得 DNA 聚合酶恢复了完全的聚合酶活性，例如 Clontech 公司的热启动 Taq 酶。化学修饰 DNA 聚合酶法是利用化学基团修饰 DNA 聚合酶的活性中心，使其失活，在 94℃变性数分钟后，可以破坏修饰基团，使聚合酶重新恢复催化活性，例如 QIAGEN 公司的 Hotstart 和 PE 公司的金牌酶都是利用这种原理制成的。

(2) 递减 PCR (touch down PCR):递减 PCR 通过在 PCR 的前几个循环使用严格的复性条件来提高特异性。循环在比估算的 T_m 高大约 5℃的复性温度下开始,然后每个循环降低 1～2℃,直到复性温度低于 T_m 5℃时停止。特异性最高的目的模板会被优先扩增,这些产物在随后的循环中继续扩增占据优势。递减 PCR 对于那些不了解引物和目的模板同源性程度的方法更为有用,如 AFLP、DNA 指纹分析等。

(3) 巢式 PCR(nest PCR):使用巢式引物进行连续多轮扩增可以提高特异性和灵敏度。第一轮是 15～20 个循环的标准扩增。将一小部分起始扩增产物稀释 100～1000 倍加入到第二轮扩增中进行 15～20 个循环,或者也可以通过凝胶纯化将起始扩增产物进行大小选择后进行第二轮扩增。在第二轮扩增中使用一套巢式引物,其可以同第一套引物内侧的靶序列结合。巢式 PCR 的使用降低了扩增多个靶位点的可能性。因为同两套引物都互补的靶序列很少。而使用同样的引物对进行总数相同的循环(30～40)会扩增非特异性靶位点。巢式 PCR 可以增加有限量靶序列(如稀有 mRNA)的灵敏度,并且提高了困难 PCR 的特异性。

3. 扩增产物电泳呈涂布状

扩增产物电泳呈涂布状称为 smear(图 9.5),可以按照表 9.4 进行分析和改进。

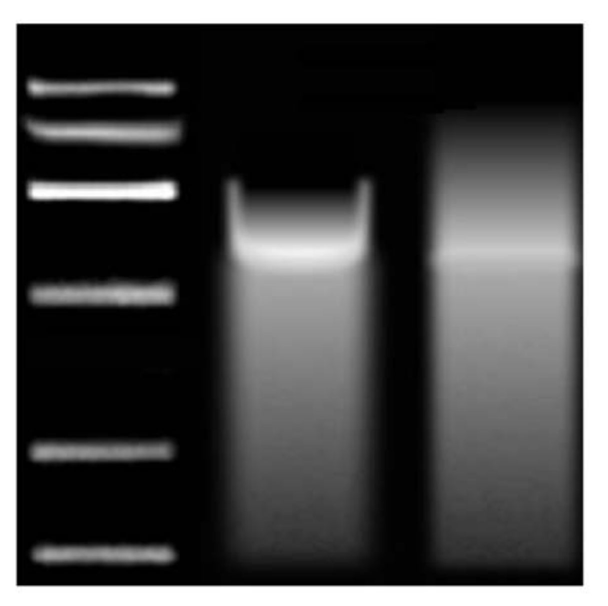


图 9.5　PCR 产物的电泳 smear 现象

表 9.4　扩增产物电泳出现 smear 原因的分析及对策

原因	建议	原因	建议
引物浓度过高	0.1 μmol · L^{-1}间隔递减	复性温度过低	2 ℃ 间隔递增
引物设计不合理	重新设计	延伸时间过短	1 min 间隔递增
酶量过多	0.5 U 间隔递减	模板量过多	模板量 20%间隔递减
循环次数过多	两个循环间隔递减		

4. 假阳性

假阳性是指空白对照出现目的扩增产物，其原因一般是源于靶序列污染所致。由于 PCR 的高灵敏度，所以极微量的污染也会导致假阳性结果。在以有无靶序列扩增产物作为诊断标志时，消除污染，排除 PCR 的假阳性显得尤为重要。

污染的 DNA 可能有 3 个来源：来自其他测试样品的 DNA；来自试验材料如重组克隆的 DNA；第三种称为“遗留污染”，产生于吸取和操作 PCR 样品时的气溶胶，这种污染最为麻烦。

避免污染，减少假阳性的主要方法有：

(1) 划分操作区：目前，普通 PCR 尚不能做到单人单管，实现完全闭管操作。但无论是否能够达到单人单管，均要求实验操作在 3 个不同的区域内进行，PCR 的前处理和后处理也要在不同的隔离区内进行。标本处理区，包括扩增模板的制备；PCR 扩增区，包括反应液的配制和 PCR 扩增；产物分析区，包括凝胶电泳分析，产物拍照及重组克隆的制备。各工作区要有一定的隔离，操作器材专用，要有一定的方向性。如：标本制备⟶PCR 扩增⟶产物分析⟶产物处理。而且注意产物分析区的产物及器材不要拿到其他两个工作区。

(2) 紫外线照射减少 PCR 污染：紫外线预防 PCR 污染的主要原理是紫外线照射可在 DNA 分子中相邻嘧啶碱基之间形成内嘧啶二聚体，从而抑制聚合酶介导的链延伸反应。紫外波长(nm)一般选择在 254/300 nm，照射 30 min 即可。需要注意的是，选择 UV 消除残留 PCR 产物污染时，要考虑 PCR 产物的长度与产物序列中碱基的分布，UV 照射仅对 500 bp 以上长片段有效，对短片段效果不大。此外，紫外线照射时被照射物表面应与光源垂直以达到最强的光强度，否则可能效果不佳。

(3) 酶处理 PCR 产物的遗留污染可采用下列方法：

DNase I 法：PCR 混合液(未加模板和 Taq 聚合酶)加入 0.5 U DNase I，室温反应 30 min 后加热灭活，然后加入模板和 Taq 聚合酶进行正常 PCR 扩增。该方法的优点是不需知道污染 DNA 的序列。

内切酶法：选择识别 4 个碱基的内切酶(如 Msp I 和 Taq I 等)，可同时选择几

种,以克服用一种酶只能识别特定序列的缺陷,室温作用 1 h 后加热灭活进行 PCR。

尿嘧啶糖苷酶(UNG)法:用 dUTP 代替 dTTP,使产物中掺入大量尿嘧啶碱基。在再次进行 PCR 扩增前,用 UNG 处理 PCR 混合液。UNG 裂解尿嘧啶碱基和糖磷酸骨架间的 *N*-糖基键,产生相应的无碱基位点,阻止 TaqDNA 聚合酶的延伸即可消除 PCR 产物的残留污染。由于 UNG 在 PCR 循环中的变性一步便可被灭活,因此不会影响样本的扩增。

(4) 稀酸处理法:对可疑器具用 1 mol · L^{-1} 盐酸擦拭或浸泡,使残余 DNA 脱嘌呤。

(5) 设立对照:通过设立一系列阴性对照,如不加模板 DNA、不加聚合酶等,排除试剂的污染情况。如果这些阴性对照不出现扩增反应,则说明 PCR 分析结果的可靠性,反之如在阴性对照中出现扩增,则表明试剂或模板污染,需要进一步确认污染的物质,并最终去除被污染的试剂。

(6) 实验操作注意事项:

戴一次性手套,若不小心溅上反应液,立即更换手套。

使用一次性吸头,严禁与 PCR 产物分析室的吸头混用,吸头不要长时间暴露于空气中,避免气溶胶的污染。

避免反应液飞溅。打开反应管时为避免此种情况,开盖前应稍离心收集液体于管底。若不小心溅到手套或桌面上,应立刻更换手套并用稀酸擦拭桌面。

操作多份样品时,制备反应混合液,先将 dNTP、缓冲液、引物和酶混合好,然后分装,这样既可以减少操作,避免污染,又可以增加反应的精确度。

最后加入反应模板,在加入后盖紧反应管。

尽可能用可替换或可高压处理的加样器,由于加样器最容易受产物气溶胶或标本 DNA 的污染,最好使用可替换或高压处理的加样器。如没有这种特殊的加样器,至少 PCR 操作过程中的加样器应该专用,不能交叉使用,尤其是 PCR 产物分析所用加样器不能拿到其他两个区。

重复实验,验证结果,慎下结论。

9.2.5　实时 PCR

实时 PCR(real-time PCR)也被称为荧光定量 PCR(fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)。通过实时 PCR,可以在线监测 PCR 反应进程中产物的变化。为提高灵敏度和方便检测,实时 PCR 利用了荧光技术,如荧光染料或荧光标记的探针。它们可与 PCR 过程中的扩增产物结合,在 PCR 的每一次循环中,都可观察到荧光强度的变化,这种变化对应于扩增产物量的增加。通过绘制标准曲线,最终可得到反应初期的靶基因数量。

实时 PCR 的方法有如下特点:①用动力学推算靶基因含量,比通过终点产物量的方法具有更高的准确性;②与常规 PCR 相比,实时 PCR 的特异性更强;③反应结束后不需要后续检测(如电泳)即可得出结果,故能有效解决 PCR 产物污染的问题;④实时 PCR 自动化程度较高,能通过计算机对模板进行自动准确定量;⑤其检测敏感性高(可以低至 1 拷贝/μl),线性范围宽,重复性好,测定结果十分稳定。

实时 PCR 的原理是利用循环阈值(cycle threshold, Ct)进行定量。研究表明,每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,且起始拷贝数越多,Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,其中横坐标代表起始拷贝数的对数,纵坐标代表 Ct 值。只要获得未知样品的 Ct 值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数(图 9.6、图 9.7)。

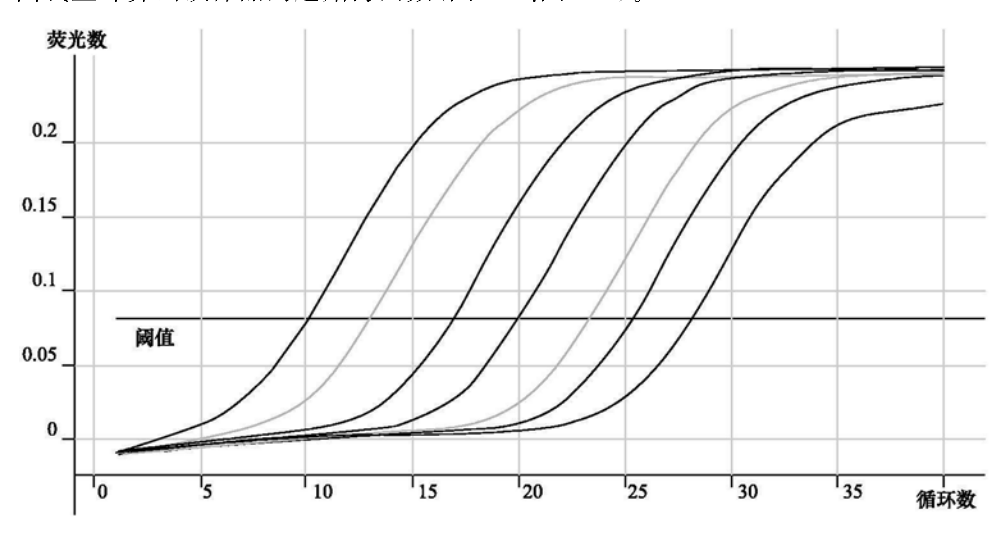


图 9.6　实时 PCR 进程曲线

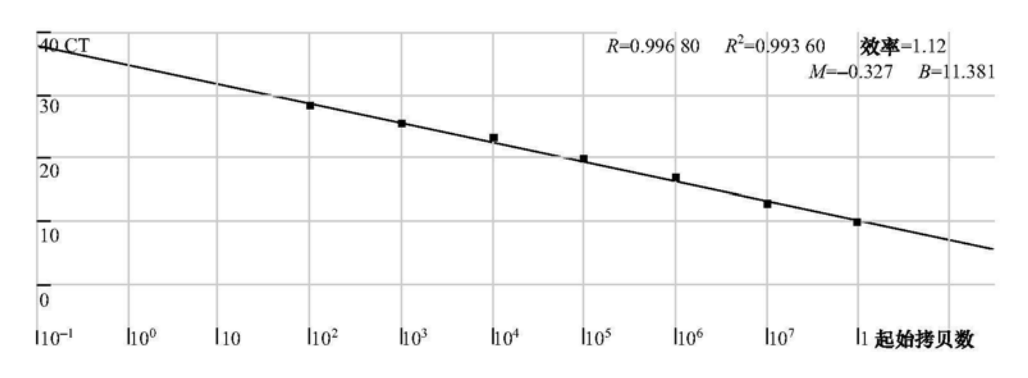


图 9.7　实时 PCR 标准曲线

实时 PCR 荧光技术大体上可以分为两类，一类是双链 DNA 染料结合法，另一类是基于荧光探针的方法。

1. DNA 染料结合法

此方法的原理是使用的小分子荧光染料，在与双链 DNA 结合后，可发出荧光(图 9.8)。在 PCR 进程中，双链 DNA 不断增多，与之结合的染料也不断增多，因而荧光强度不断增强。

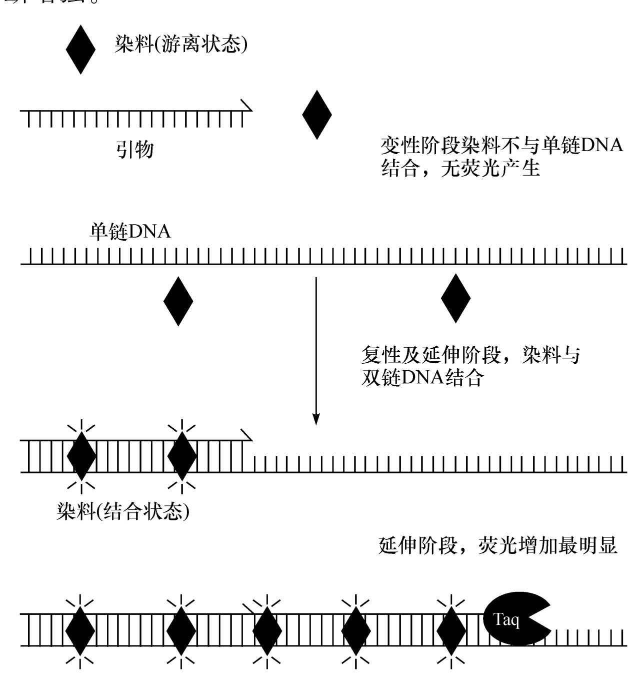


图 9.8　DNA 染料结合法原理

荧光染料分为两大类(表 9.5)：一类是插入型染料，即染料是插入到双链 DNA 分子内部，产生荧光；另一类是外部结合型染料，它们并不插入到双链 DNA 分子内部，而是与 DNA 双链的沟部结合，产生荧光。对荧光染料的基本要求是：与 DNA 双链结合后，荧光强度应增强，同时染料不能对 PCR 扩增有抑制作用。

表 9.5　常用的 DNA 染料

插入型染料	外部结合型染料	插入型染料	外部结合型染料
溴化乙锭	偏端霉素	放线菌素 D	4′,6-二脒基-2-苯基吲哚
柔红霉素	纺锤菌素	SYBR Green	

DNA 染料结合法的优点在于相对简便，只要是双链 DNA，就可与之结合，故

适用于所有的靶基因。但是也正是因为其可与任何双链DNA结合的特性，使其不能区分非特异性双链核酸，当PCR反应中有非特异性扩增时，荧光染料也可与非特异性产物结合，产生荧光干扰 。另外PCR反应产生的错配产物和引物二聚体也会干扰结果。

2. 荧光探针法

基于荧光探针的方法有很多种，但其主要原理都是通过荧光探针在PCR中的结构或构相变化来实现荧光强度的变化，从而绘制扩增曲线，最终实现定量检测。

1）水解探针法（hydrolysis probe，商品名为Taqman）

该方法的原理是利用DNA聚合酶的5′→3′外切核酸酶的活性，降解一段特异性的荧光探针，从而产生荧光[2]（图9.9）。探针是一段长度为20～30bp的寡核苷酸，只与模板特异性地结合，结合区域在两条引物之间。探针的5′端标记有报

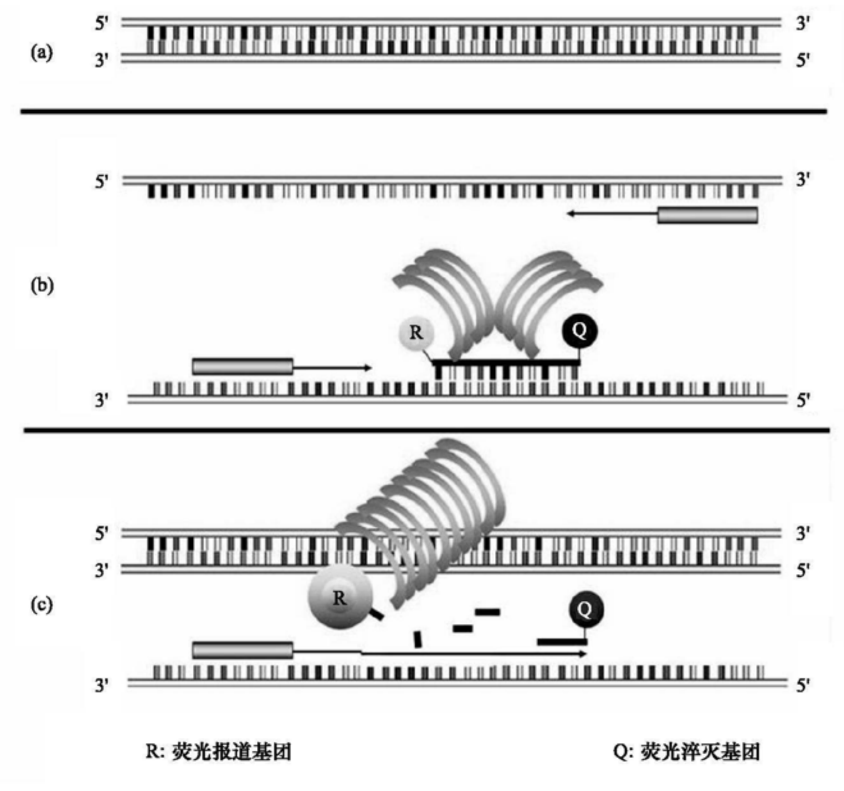


图9.9 水解探针方法原理

（a）双链DNA；（b）3′端的荧光淬灭基团Q吸收5′端报道基团R的荧光信号；（c）探针5′端连接的报道基团R被Taq酶切下，发出荧光

道基团(reporter, R),3′端标记有荧光淬灭基团(quencher, Q)。完整的探针 5′端和 3′端在空间上距离较近,报道基团所发射的荧光能量能被淬灭基团吸收,从而使向外发射的荧光减弱,这个过程称为荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)。荧光探针被加到 PCR 反应体系中,在复性阶段,探针与 DNA 模板结合,由于 FRET 的作用,报道基团产生的荧光被淬灭基团吸收,故检测不到荧光。随着 PCR 链延伸过程的进行,DNA 聚合酶遇到与模板结合的探针,其 5′-3′外切核酸酶活性就会将探针切断,使报道基团远离淬灭基团,产生荧光信号。所以,每经过一次 PCR 循环,荧光信号也同扩增片段一样,有一个同步指数增长的过程。信号的强度就代表了模板 DNA 的拷贝数。

2) 杂交探针法(hybridization probe,商品名 Lightcycler)

该方法使用两个直线形寡核苷酸探针来增强反应特异性[3]。其中一个探针的 3′端有一个荧光素供体(donor),可在激发光作用下产生绿色荧光。荧光的发射光谱与另一探针 5′端的受体荧光基团(acceptor fluorophore)相交叠,荧光素供体受激发后产生的荧光共振能量可转移给受体基团,使受体荧光基团发出红色荧光。当探针游离时,两条探针分开,无法传递能量,不产生红色荧光;当探针与靶序列在 PCR 复性阶段结合后,两条探针重新与模板结合,两荧光基团距离靠近,进行能量传递,又产生红色荧光(图 9.10)。随着模板数量的增加,上面所结合的探针也增多,因此荧光强度可反映 PCR 产物的变化。杂交探针方法使用两个荧光探针,在一定程度上提高了检测特异性。但是由于两个探针都与模板结合,可能会影响扩增效率。

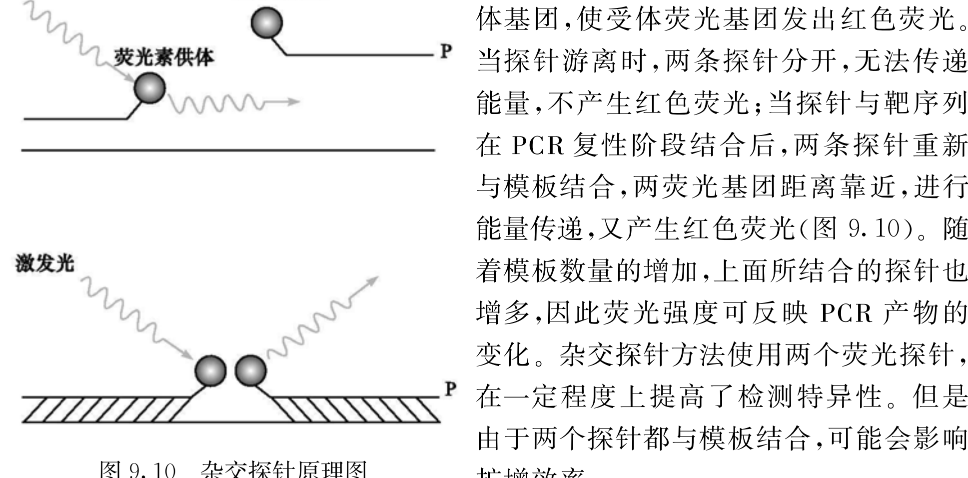


图 9.10　杂交探针原理图

3) 分子信标

分子信标是一种基于荧光能量转移原理而设计的发夹形寡聚核酸荧光探针。它通过与核酸等靶分子相互作用后发生的构象的变化而产生荧光信号[4]。

分子信标由两部分组成,一部分是与靶基因碱基序列互补的寡核苷酸序列,是检测靶基因的部分,位于探针的中间,另一部分是分别在 5′端和 3′端的荧光物质和荧光淬灭物质。探针 5′端和 3′端有几个互补的碱基存在,因而可形成两端反转配对,构成探针的茎部 。

分子信标的茎环结构中,环一般为 15～30 个核苷酸,并与目标序列互补;茎一般为 5～7 个核苷酸长,并相互配对形成茎的结构。荧光基团标记在探针的一端,而淬灭剂则标记在另一端。在复性温度下,当模板不存在时形成茎环结构,当加热变性时互补配对的茎环双链解开,如果有模板存在环序列将与模板配对。与模板配对后,分子信标将成链状而非发夹状,使得荧光基团与淬灭剂分开。当荧光基团被激发时,因淬灭作用被解除,可发出荧光(图 9.11)。

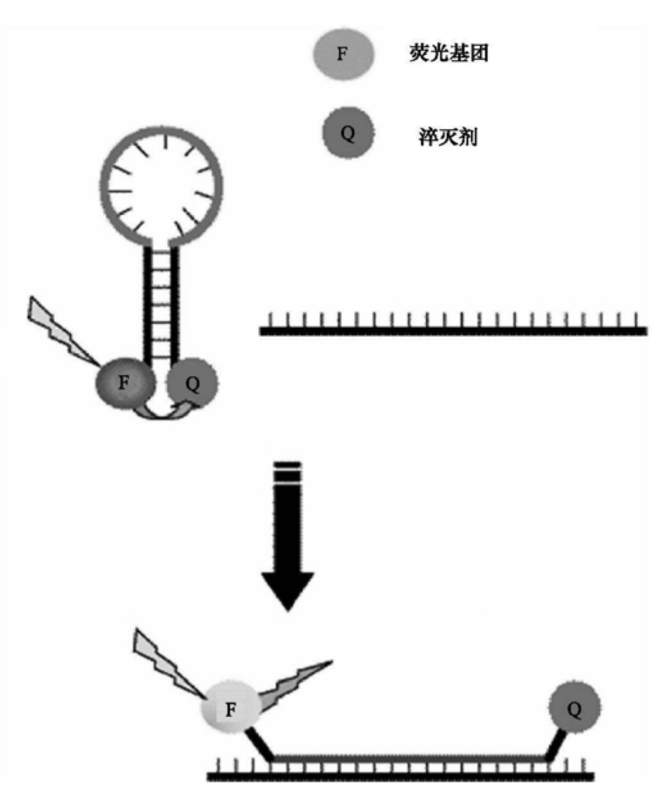


图 9.11　分子信标原理图

4) Lux 引物

LUX 引物是利用荧光标记的引物实现定量的一项新技术,目的是用类似分子信标的发夹结构设计引物,使引物同时起到荧光探针的作用[5]。引物对中的一个引物 3′端用荧光报道基团标记。在没有单链模板的情况下,该引物自身配对,形成发夹结构,使荧光淬灭;在模板存在的情况下,引物与模板配对,发夹结构打开,产生荧光信号(图 9.12)。使用 LUX 引物,不需要专门设计探针,即省了成本又给实验设计提供了宽松的条件。

其他的荧光探针技术还包括蝎子帽(scorpions) 探针、发夹式引物等,都是在

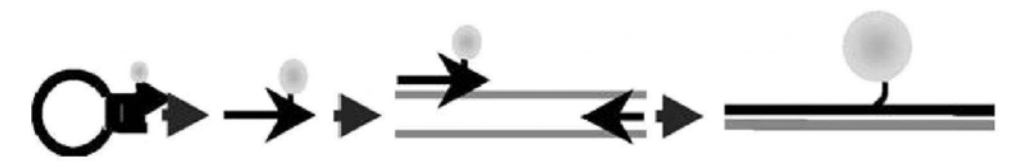


图 9.12　LUX 引物工作原理

以上技术基础上的改进。荧光探针最大的优点是它只检测特异性的靶基因，因此特异性较高。理论上可针对不同的靶序列设计多个不同的荧光探针，在一次 PCR 反应中同时检测多个靶序列，即多重实时 PCR 或多重定量 PCR。

9.2.6　逆转录-PCR

RT-PCR 是以 RNA 为对象所进行的 PCR 扩增。由于 RNA 不能作为模板直接用于 PCR 扩增，所以往往先进行逆转录反应(reverse transcription，RT)，使用逆转录酶(也称为依赖 RNA 的 DNA 聚合酶)将 mRNA 逆转录为 DNA 序列(cDNA)。cDNA 可以作为模板用于 PCR 扩增。该技术可用于从 mRNA 中获取目的基因或检测 mRNA 的基因表达。

逆转录生成 cDNA 的方式主要有 3 种：①使用 PCR 扩增所用的下游引物作为逆转录的引物，它与 mRNA 的 3′末端结合，引发逆转录；②以多聚脱氧胸苷酸(oligo-dT)(图 9.13)作为引物，oligo-dT 与 mRNA3′末端多聚腺苷酸尾巴互补，引

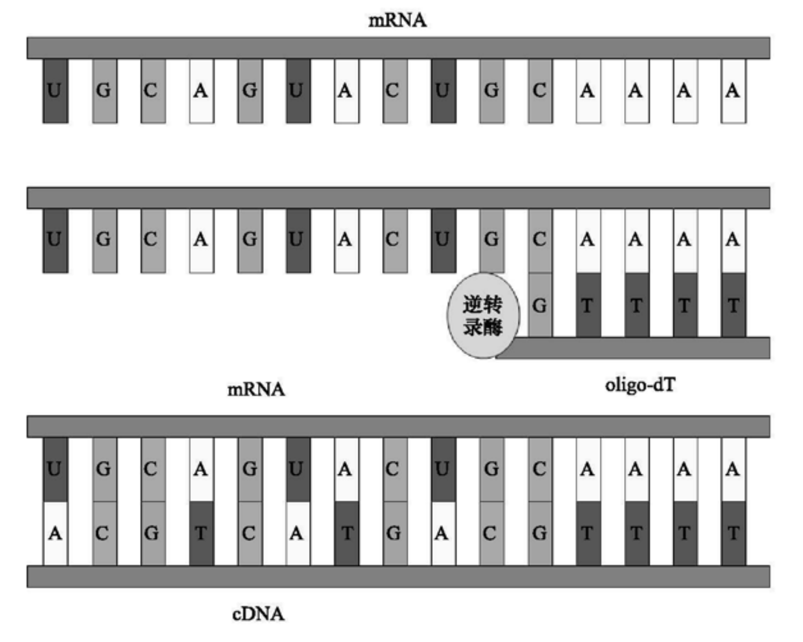


图 9.13　以 oligo-dT 为引物进行逆转录的示意图

发逆转录；③用人工合成的随机序列六核苷酸混合物为引物，这些引物随机结合到 mRNA 的任何部位，可以较容易的合成完整的 cDNA。

逆转录反应可以和 PCR 反应在同一个反应管内进行。最初，反应管内的是 RNA 模板，同时也有上下游引物(其中下游引物可以和 RNA 相应区域互补结合)和 dNTP。首先进行逆转录反应，即 RNA 模板在 72 ℃变性，随后降温至 42 ℃，使引物和 RNA 复性，逆转录酶催化引物从 5′→3′延伸，从而合成 RNA 和互补序列 cDNA。随后，进入 PCR 扩增阶段，在 95 ℃变性条件下，逆转录酶被降解失活，再以 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。

9.3　核酸测序

4 种脱氧核苷三磷酸的不同组合蕴涵着核酸的功能，因此，对核酸进行序列分析，是研究核酸功能的基础。随着人类基因组计划(human genome project，HGP)的实施，快速的自动化测序技术得到了飞速发展，同时其他一些新的测序技术也不断涌现，如 DNA 芯片原理的杂交测序技术和基于化学反应原理的焦磷酸测序技术等，这些新的测序技术开拓了核酸测序的应用范围。在当今，核酸测序技术已经成为生物化学研究领域中发展最快和不可或缺的技术之一，通过核酸序列测定有助于探索基因结构与功能、基因与疾病的关系。基因的分离、定位、转录、基因产物的表达、基因工程载体的构建、基因片段的合成和探针的制备等都与之有关。

核酸测序研究的先驱是 Walter Gilbert 和 Frederic Sanger，他们因在核酸测序研究中的杰出贡献(分别发明了化学降解测序法和链末端终止测序法)[6,7]，分享了 1980 年的诺贝尔化学奖。

化学降解测序法和链末端终止测序法两种方法虽然原理大相径庭，但都是同样生成互相独立的若干组带放射性标记的寡核苷酸。每组寡核苷酸都有固定的起点，但却随机终止于特定的一种或者多种残基上。由于 DNA 上的每一个碱基出现在可变终止端的机会均等，因此上述每一组产物都是一些寡核苷酸混合物，这些寡核苷酸的长度由某一种特定碱基在原 DNA 全片段上的位置所决定。然后在可以区分长度仅差一个核苷酸的不同 DNA 分子的条件下，对各组寡核苷酸进行电泳分析，只要把几组寡核苷酸加样于测序凝胶中若干个相邻的泳道孔道上，即可从凝胶的放射自显影片上直接读出 DNA 上的核苷酸顺序。

无论是链末端终止测序法还是化学降解测序法，都是分为 4 个反应体系进行测序反应，寡核苷酸链分别终止于不同位置的 A、G、C、T 碱基。4 种反应体系的寡核苷酸链产物在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中上样于相邻的加样孔进行分离。两种方法都要依赖高分辨率变性聚丙烯酰胺凝胶。变性聚丙烯酰胺凝胶能分离长度为 300～800 bp 的单核苷酸片段，并能分辨相互间长度仅相差一个碱基的单核苷

酸链。对于一个待测序列,需要以其为模板合成或直接将其转变成一系列单链DNA片段,这些片段长度以一个核苷酸的差值连续递增。由于产生的不同长度的寡核苷酸链存在于4种反应体系中,从放射自显影后的4种末端的寡核苷酸链图形可以直接读出待测DNA的连续序列。

9.3.1　测序时限制性内切酶的使用

由于从细胞中提取出的DNA片段通常较长,受到测序能力的限制,不能直接用于序列分析,所以必须将长链DNA打断为800bp左右的短片段,才能进行测序分析。因此,需要使用限制性内切酶(简称限制性)对核酸序列进行切割。限制性内切酶多来源于细菌,可与DNA序列上的限制酶识别位点特异结合,并在此位点切割双链DNA。绝大多数限制性内切酶识别长度为4～8个核苷酸,且呈二重对称的特异序列。常见的内切酶及其酶切位点见表9.6。

表9.6　常见的内切酶及其酶切位点

内切酶	识别序列和切割位点	来源菌株
Alu Ⅰ	AG▼C*T	*Arthrobacter luteus*
*Bam*HⅠ	G▼GATCT	*Bacillus amyloliquefaciens H*
Bgl Ⅰ	GCCNNNN▼NGCC	*Bacillus globigii*
Bgl Ⅱ	A▼GATCT	*Bacillus globigii*
*Eco*RⅠ	G▼AA*TTC	*Escherichia coli RY 13*
*Eco*RⅡ	▼CC*WGG	*Escherichia coli RY 245*
*Eco*RⅤ	GA*T▼ATC	*Escherichia coli I62P7G74*
Hae Ⅱ	RGCGC▼Y	*Haemophilus aegyptius*
Hae Ⅲ	GG▼C*C	*Haemophilus aegyptius*
Hind Ⅲ	A*▼AGCTT	*Haemophilus influenzae Rd*
Hpa Ⅱ	C▼C*GG	*Haemophilus parainfluenzae*
Msp Ⅰ	C*C▼GG	*Micrococcus species*
Pst Ⅰ	CTGCA*▼G	*Providencia stuartii 164*
Pvu Ⅱ	CAG▼C*TG	*Proteus vulgaris*
Sal Ⅰ	G▼TCGAC	*Streptomyces albus G*
Taq Ⅰ	T▼CGA*	*Thermus aquaticus*
Xho Ⅰ	C▼TCGAG	*Xanthomonas holcicola*

注:▼表示切割位点;A*代表N^6-甲基腺嘌呤;C*代表5-甲基胞嘧啶;
W代表碱基A或T;R代表碱基A或G;Y代表碱基T或C;N代表任何一种碱基

将长链DNA用特定的限制性内切酶消化后,可产生一系列特定长度的DNA

片段,通过琼脂糖凝胶电泳能够将这些片段一一分离出来。随即将短片段在高温下变性,使其解链为单链,经琼脂糖凝胶电泳分离后,方可用于测序分析。在第一次酶切后,产生的某些 DNA 片段仍然有可能大于 800bp,此时需要选用第二种限制性酶切酶进行二次酶切,以满足测序的要求。一个特定的 DNA 片段可以用一系列的内切酶连续消化,或者用几种内切酶同时消化,其消化产物经过琼脂糖凝胶电泳分离后,产生的特定电泳条带称为限制性酶谱。

总之,经过限制性酶切作用以及电泳分离和双链 DNA 变性,最终产生了可用于核酸序列分析的单链 DNA 片段。

9.3.2　链末端终止测序法

链末端终止测序法也称为双脱氧终止法或 Sanger 法,是以单链或双链 DNA 为模板,在合成新的 DNA 过程中对靶序列进行测定,因此又称为引物合成法或酶促引物合成法。这一方法是基于 DNA 聚合酶的以下特性:能以 DNA 为模板,根据碱基配对的原则逐个将 dNTP 加到与模板结合的寡核苷酸引物的 3′-OH 末端,形成正确的模板 DNA 互补链;能以 dNTP 作为底物,也能利用双脱氧核糖核苷酸(ddNTP)做底物,将其掺入寡核苷酸链的 3′末端而终止新生互补链的延伸。反应中,ddNTP 终止链合成是该方法的核心。

ddNTP 终止链延伸反应的原理是:与 dNTP 相比,ddNTP 的 3′位核糖缺少羟基(图 9.14),但在 DNA 聚合酶作用下,仍然可以通过 5′-磷酸基团与引物链的 3′-羟基反应掺入到引物链中。由于 ddNTP 核糖没有 3′-羟基,所以不能继续与下一个 5′-磷酸基团形成新的磷酸二酯键而导致引物链延伸终止。

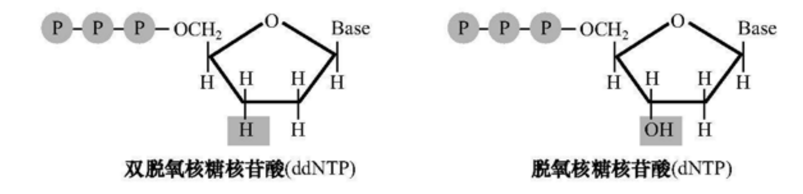


图 9.14　ddNTP 和 dNTP 的结构

链末端终止测序法的基本过程是:设置 4 个反应管(A、G、C、T 管,分别代表一种脱氧核苷三磷酸),每管各加入一种 ddNTP(A 管中加入 ddATP,G 管中加入 ddGTP,以此类推)和 4 种 dNTP。合成过程中,每管中的 ddNTP 和相对应的 dNTP 竞争掺入到新产生的 DNA 链上。由于 ddNTP 比例低,因此,终止的位点是随机的。经过一段时间反应,每个反应管中就会合成不同长度的混合物,它们具有相同的 5′端,而 3′端因掺入 ddNTP 的种类不同分别以 A、G、C、T 结尾,使各片段相差一个碱基。引物或 dNTP 中至少一种用放射性核素标记(如 a-^{32}P),以便进

行放射自显影。待反应结束后，利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，将 4 个反应管内的样品分别点在相邻的 4 个电泳孔道，进行电泳分离，经放射自显影后从下至上读出待测核酸序列的互补序列(图 9.15)。

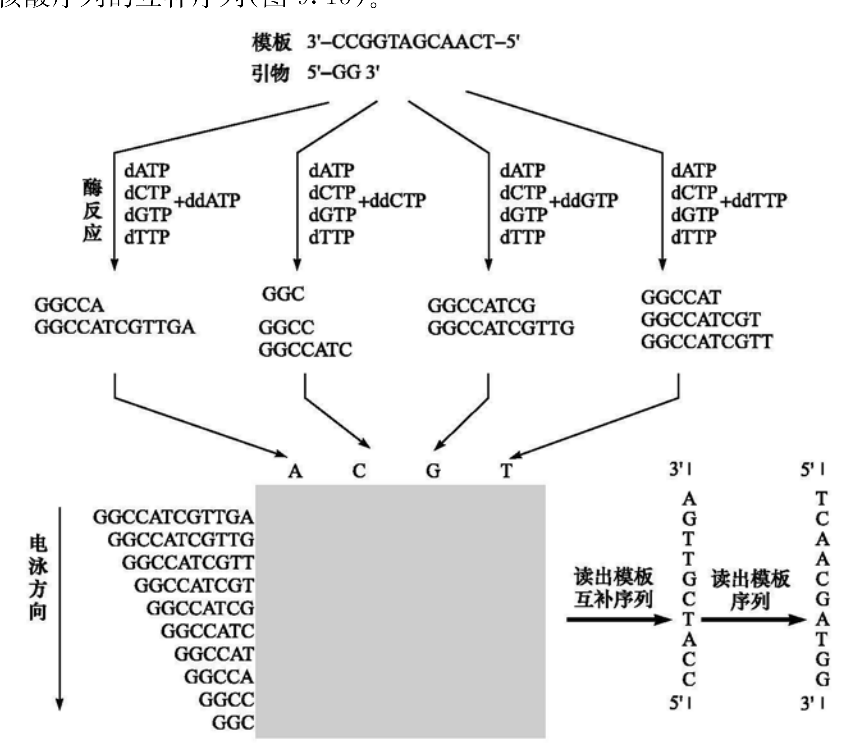


图 9.15　链末端终止测序法

9.3.3　化学降解测序法

化学降解测序法(Maxam-Gilbert 法)是在链的降解反应过程中对 DNA 链进行测序。它是在 4 组互相独立的化学反应中，利用碱基特异性化学试剂切割 DNA 链末端标记的碱基分子(表 9.7)。化学试剂在特定碱基位置降解单链 DNA，各产生一套长短不一，但是都终止于某一碱基的 DNA 片段。经电泳和放射性自显影后，从 4 个反应系统统一阅读，待测 DNA 的全部核苷酸序列就可直接读出(图 9.16)。

表 9.7　碱基切割试剂的特点

修饰试剂	碱基修饰反应	碱基断裂试剂	断裂点
硫酸二甲酯	鸟嘌呤甲基化	六氢嘧啶	G
甲酸	脱嘌呤作用	六氢嘧啶	G + A
肼	嘧啶开环	六氢嘧啶	C + T
肼(加盐)	胞嘧啶开环	六氢嘧啶	C

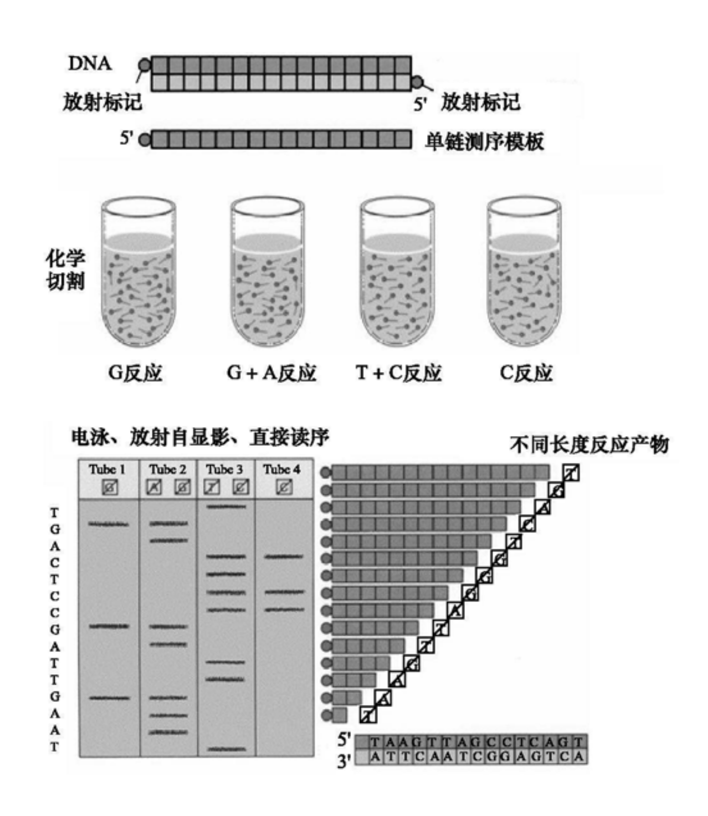


图 9.16　化学降解测序法

不论是链末端终止测序法还是化学降解测序法都具有很强的测序能力，虽然化学降解测序法比链末端终止测序法在操作上简单一些，但是链末端终止测序法却更容易实现自动化。

链末端终止测序法和化学降解测序法都是用于 DNA 的测序技术，但也都可以同时用于 RNA 的测序。只是在测序前，先要经过逆转录反应将 RNA 逆转录为其互补 DNA(cDNA)，随后用以上 DNA 测序技术进行分析。

9.3.4　毛细管电泳测序法

无论是链末端终止测序法还是化学降解测序法在手工操作时，都不可避免的存在放射性核素污染、步骤烦琐、速度慢等缺点，利用放射自显影技术读片更是耗时而乏味的工作。随着对核酸研究的深入，尤其是人类基因组计划的实施，传统的手工测序已远远不能满足其大规模测序的要求，毛细管电泳的出现，极大地提高了测序的效率，为自动化和高通量大规模测序提供了基础。

毛细管电泳是以高压直流电场为驱动力，在细内径的毛细管内使荷电粒子按

淌度或分配系数进行分离的一种电泳技术(详见毛细管电泳有关章节)。毛细管电泳测序仍然利用了链末端终止的原理,主要在标记技术和切点识别技术上做了改进,以便进行自动化分析。

在标记方式上,采用荧光标记方式,代替传统的放射性核素标记,用激光诱导荧光检测器(laser induced fluorescence detector,LIF)进行信号检测。其荧光标记有多种策略,主要包括:

(1) 标记引物:根据链末端终止测序法的原理设置 4 个反应管,加入相应原料,摒弃放射性标记而选择用荧光染料标记测序引物的 5′端。这样,当反应结束时,所有的片段都带上了荧光标记。

(2) 标记 ddNTP:将终止剂 ddNTP 用荧光物质标记,使断裂片段带上荧光,用 LIF 在线检测。

在进行不同片段切点识别时,毛细管电泳采用并行分离法和多道检测(串行)法。

(1) 并行分离法:使用一种荧光物质标记引物或 4 种 ddNTP,使所有片段产生同种荧光,将 4 个反应管的产物在 4 组毛细管中一次性检测或在一组毛细管中分 4 次检测。

(2) 多道检测(串行)法:利用 4 种不同的荧光物质标记 ddNTP 或引物,使 4 种碱基带上不同的“身份”,在进行测序反应时,不同末端的片段具有不同的荧光标记,产物只需要进行一次毛细管电泳分离就足够了。

标记引物时,4 个反应管中每管含有 4 种 dNTP、一种 ddNTP 和一种荧光标记的引物,但是标记的荧光物质各不相同,因此,可以作为不同碱基末端的标志(图 9.17)。DNA 聚合酶催化合成互补的新链时,由于 ddNTP 随机终止结合反应而形成不同长度的片段,每种 ddNTP 终止反应所产生的片段带有各自的荧光物质的标记。在反应结束后,可以将 4 个反应管内的产物混合,在同一电泳泳道内进行电泳,激发光激发时荧光物质产生荧光,荧光监测仪进行扫描检测,不同的荧光即代表不同的碱基,通过计算机进行测序分析。

标记 ddNTP 时,4 种 ddNTP 分别用不同的荧光物质标记(图 9.18),这样测序反应不必分成 4 管,只需要设置一个反应管(含有 4 种 dNTP 和 4 种 ddNTP)。终止反应的产物按终止位置碱基不同在其 3′ 端具有不同的荧光基团,被激发后产生不同的荧光,因而可在同一电泳加样孔内进行电泳。电泳分离后,通过计算机进行测序分析。

毛细管电泳测序的基本流程为:

第一步:提取目标 DNA,酶切成合适长度,克隆或扩增得纯的单链 DNA;

第二步:在单链 DNA 中加入荧光标记引物或荧光标记的 ddNTP、DNA 聚合酶和 dNTP,进行竞争复制;

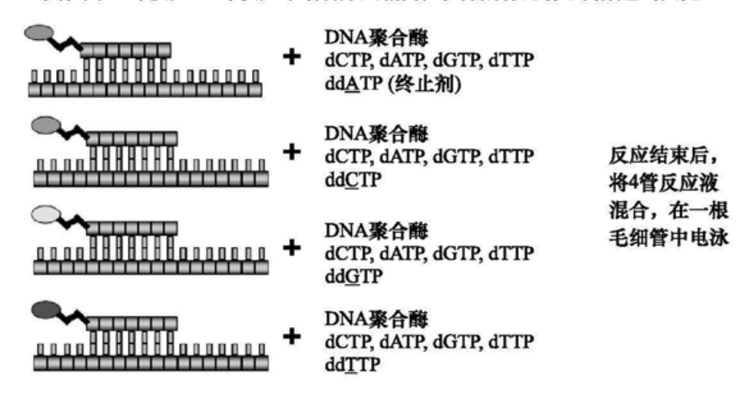


图 9.17　标记引物多道检测法

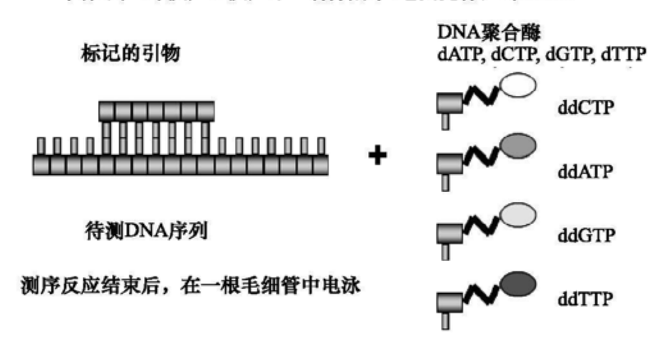


图 9.18　标记 ddNTP 多道检测法

第三步：用单管或 4 管 CE-LIF 分析 4 种测序产物，得到 A、G、C、T 4 个谱图；

第四步：将图谱重叠，从小到大读出序列；

第五步：根据碱基互补翻译出原序列；

第六步：扣除引物带来的序列，得到 DNA 序列。

毛细管电泳分离 DNA 测序的分离速度有大幅度提高，但毛细管电泳每次仅能分离 1 个样品，与平板电泳相比较，分析样品通过量及分析效率均未提高。在基因组项目中，必须达到高速及高通过量，才能满足 DNA 序列分析的要求。目前主要通过阵列毛细管电泳（capillary array electrophoresis）的方法，将多根毛细管排列成阵列同时进行毛细管电泳，满足了高速和高通过量的要求。目前的自动化基因分析仪多采用这种方式。

9.3.5　核酸序列分析新技术

除了在测序中使用毛细管电泳技术提高速度和分辨率外，目前还有其他一些新的测序技术，如杂交测序法、质谱法测序等。随着对核酸研究的深入，单纯核酸序列测定已经不能满足核酸分析的需要，研究者目前越来越关注核酸位点的变异分析，相关的分析技术也不断发展。焦磷酸测序（pyrosequencing）、变性高效液相色谱（denaturing high performance liquid chromatography，DHPLC）就是这些技术中的代表，它们除可以用于 DNA 序列测定外，还可以广泛用于单核苷酸多态性（SNP）分析和 DNA 甲基化的检测。

1. 杂交测序法

该法的基本原理是：如果一段较短的 DNA 探针能与靶 DNA 杂交，并形成完全的双链分子，则可以推断在靶 DNA 上存在相应的互补序列。因此杂交测序是应用一套已知序列的寡核苷酸探针去寻找靶 DNA 链上的互补序列，靶 DNA 上的序列根据杂交情况来确定。DNA 杂交测序包括两个步骤：首先是将待测的靶 DNA 分子同一组已知序列的寡核苷酸探针杂交，然后对那些能够同靶 DNA 形成完全的双链分子的寡核苷酸探针之间的碱基重叠关系做比较分析，并据此推算出靶 DNA 分子的核苷酸序列。

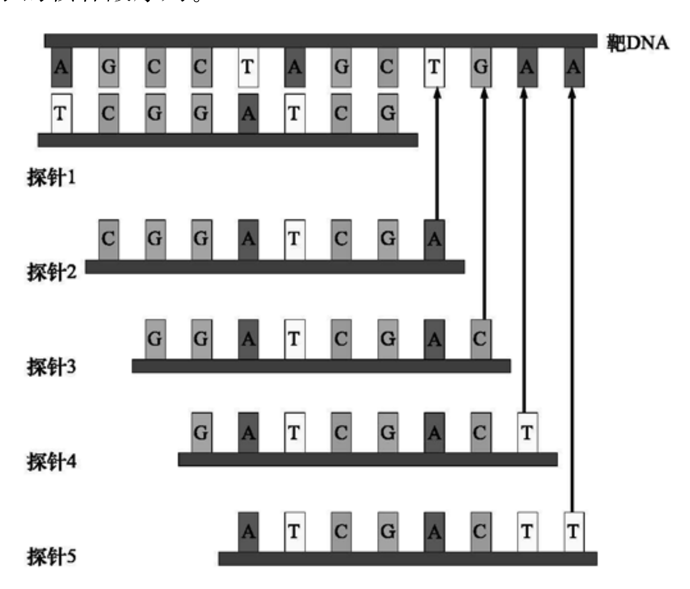


图 9.19　杂交测序法示意图

举例：如果将一种 12bp 的靶 DNA 与完全随机合成的 8bp 寡核苷酸探针混合杂

交，在总数为 65536(4^8)种的 8bp 的寡核苷酸探针中，仅有 5 种探针会与靶 DNA 杂交，形成完全互补的双链分子。由此可以推算出 12bp 的靶 DNA 序列(图 9.19)。

杂交测序的应用：①有效检测靶 DNA 中的单碱基突变；②进行不同 DNA 片段之间的序列比较；③检测不同生长发育状态下细胞中特定基因的表达状况；④检验传统测序技术的准确性。

2. 焦磷酸测序

焦磷酸测序(pyrosequencing)是一种能对大量的短链 DNA 样品进行分析的测序技术，利用酶促化学反应的原理对待测 DNA 进行精确和稳定的序列测定，特点是可在线实时测序、时间短、速度快、成本相对较低。在实际工作中，很多时候需要对已知序列的 DNA 片段进行序列验证，而这种分析往往只需要测定几十碱基序列长度即可。此时传统的测序方法未必是最佳的选择，而焦磷酸测序技术应该是目前最适合这类研究(如临床检验、单核苷酸多态性的分析等)的 DNA 序列分析技术。

焦磷酸测序实质是一种化学测序法，它利用体外 DNA 复制过程中产生的焦磷酸，促发一系列酶促级联反应，最终产生荧光信号，通过采集荧光信号，可以读出 DNA 序列[8]。其基本原理如下(图 9.20)：

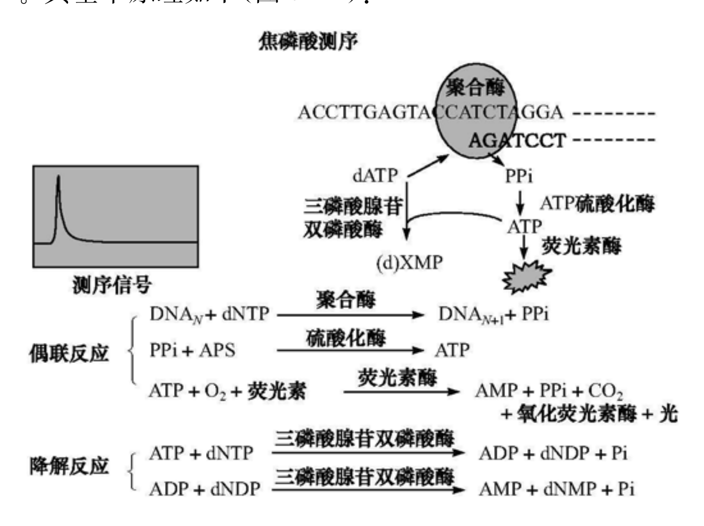


图 9.20　焦磷酸测序原理示意图(以 dATP 反应为例)

第一步：测序引物和单链的待测 DNA 模板杂交，与 DNA 聚合酶(DNA polymerase)、ATP 硫酸化酶(ATP sulfurylase)、荧光素酶(luciferase)、三磷酸腺苷双磷酸酶(apyrase)和底物 5′-硫磷酸腺苷(adenosine-5′-phosphosulfate，APS)、荧光素(luciferin)一起孵育。

第二步：4 种 dNTP(dATP，dTTP，dCTP，dGTP)之一被加入反应体系，如与

模板配对(A－T,C－G),即与引物的末端形成共价键,使dNTP的焦磷酸基团(PPi)释放出来。

第三步:ATP硫酸化酶在APS存在的情况下催化焦磷酸形成ATP,ATP驱动荧光素酶介导的荧光素向氧化荧光素(oxyluciferin)转化。氧化荧光素发出与ATP量成正比的可见光信号,光信号由CCD摄像机检测并由软件分析。每个光信号的峰高与反应中掺入的核苷酸数目成正比。

以上三步为偶联反应,产生荧光信号用于测序。

第四步:由两个降解反应构成,即由三磷酸腺苷双磷酸酶催化ATP和未参加反应的dNTP发生降解,淬灭光信号,并再生反应体系。

第五步:加入下一种dNTP进行循环反应。

在以上5个步骤循环进行过程中,互补DNA链不断合成延伸,通过软件分析可见光信号决定DNA序列。

焦磷酸测序作为一种新的测序技术,最重要的的应用领域之一是单核苷酸多态性(SNP)的研究。我们知道,人类基因组中的变异绝大多数是单个核苷酸的置换,称为单核苷酸多态性。按照1%的频率估计,在人类基因组中每100～300个核苷酸就有一个SNP,因此,整个人类基因组(3.2×10^9 bp)中至少有1100万以上的SNP。SNP的关联研究可以为寻找疾病的病因、阐明患者对药物与治疗手段的不同反应提供依据。因此,SNP研究已成为人类基因组计划现阶段重要的内容和目的之一,同时也需要适合于自动化且高通量检测SNP的技术。检测分析感兴趣的SNP,通常不需要做长链测序,只需要对位点附近的序列进行分析即可。而焦磷酸测序作为一种短链测序技术,恰好满足了这方面研究的需要。

同时焦磷酸测序也可以应用于DNA甲基化的检测中。DNA甲基化是一种表观遗传修饰,是由DNA甲基转移酶(DNA methyl-transferase, Dnmt)催化S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体,将胞嘧啶转变为5-甲基胞嘧啶(mC)的一种反应。甲基化与基因的调控和肿瘤的发生有非常密切的关系。在一般正常的细胞中,基因调控区CpG岛处于非甲基化的状态,而当细胞发生癌变后,这些区域往往呈现甲基化状态。DNA的甲基化对肿瘤的发生发展都起重要的作用。焦磷酸测序技术作为一种新的序列分析技术,能够快速地检测甲基化的频率,对样品中的甲基化位点进行定性及定量检测,为甲基化研究提供了新的途径。其最大优点是可以实现对多个甲基化位点的同时检测,如有研究者已经利用该技术同时检测了140bp片段中的15个甲基化位点,取得了良好的结果[9]。

9.3.6 测序策略

为了测定某一基因片段的碱基序列,通常需要经历克隆、测序、读序3个步骤。由于Sanger方法一般在一个测序反应中只能读取450bp左右的序列,因此基因组

DNA 大片段的序列测定需要许多的测序反应才能完成。怎样设计和组织大片段的测序工作以便快捷地测定其序列，即测序战略的确定，是关系到整个工作效率的大问题。大规模 DNA 的测序多采用从头测序，有鸟枪法（shotgun）、引物步查法（primer walking）和限制性酶切-亚克隆法（restriction endonuclease digestion and subcloning）等策略，关键是要获得连续的适合于测序的较小片段。如要通过测序进行突变定位和鉴定（即确证性测序），则采取不同策略。

1. 确证性测序

确证性测序往往只需要进行一套测序反应，获得 DNA 局部区域的核苷酸序列。它主要是对已知序列进行鉴定和证实，如次级克隆 DNA 的插入方向、突变位点检测等。因为对于该序列的背景资料比较清楚，如限制性内切酶谱等，所以只需要将待测区域片段直接克隆到测序载体上，然后进行序列测定。

2. 从头测序

从头测序的目的是要准确测定一段未知 DNA 的序列，可以选择以下方案：

1）鸟枪法

鸟枪法又称为随机克隆法，将大分子 DNA 随机地"敲碎"成许多小片段，收集这些随机小片段并将它们全部连接到合适的测序载体（如 M13 噬菌体）。小片段测序完成后，根据重叠区，计算机将小片段整合成大分子 DNA 序列（图 9.21）。该

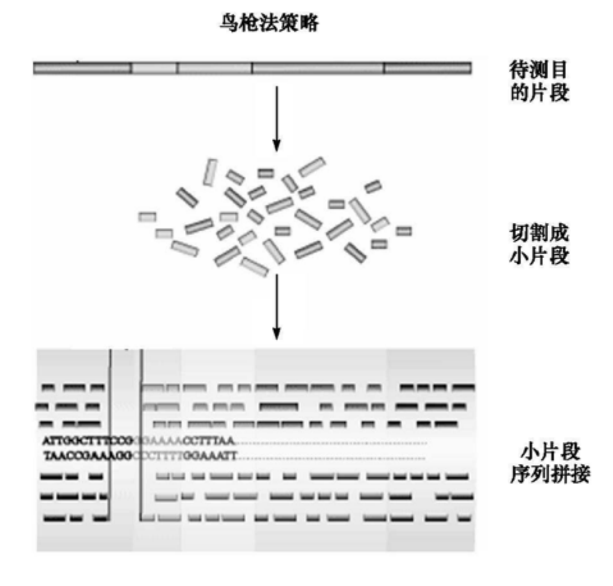


图 9.21　鸟枪法策略示意图

策略的成功实施是建立在高度自动化的 DNA 序列测定技术上的,尤其是荧光自动化测序仪以及计算机序列分析软件方面的成果。

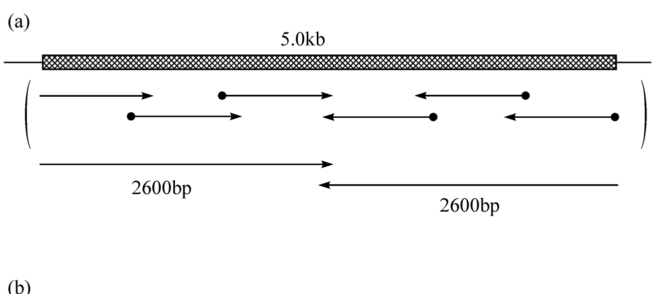
有 3 种方法可用来将 DNA 大片段切割成小片段:限制性内切酶、超声波处理和 DNA 酶 I 降解(加 Mn^{2+})。在这 3 种方法处理前, DNA 的纯化非常重要,要去除载体 DNA 或仅由载体 DNA 产生的片段。

1995 年,第一个细胞有机体——流感嗜血(haemophilus influenzae)全基因组序列被测完成,这是完全用鸟枪法策略直接完成的[10],说明鸟枪法用于微生物基因组测序是有效的。研究者直接将全基因组 DNA 打成 1.6～2.0kb 大小的片段分别克隆,共使用了 19 687 个模板,进行了 28 443 个测序反应,组建了 140 个片段重叠群。测序用时 3～4 个月,耗费 100 万美金左右。

鸟枪测序法的优点是成本低、快速、易于自动化操作,缺点是随机亚克隆易造成序列重复测定,也容易丢失某些序列。此外,测序后的数据分析工作量大,所有经鸟枪法克隆的 M13 亚克隆测序后所得的数据,都需要计算机帮助进行排序,才能得到完整的序列,这就需要强有力的计算机及其软件支持。

2) 引物步查法

引物步查法(primer walking)是一种渐进式测序策略,也是最简单的一种测序策略。该方法适合于双脱氧测序,并绕开了亚克隆小片段 DNA 的要求。最初的序列数据是通过利用载体上的引物获得的,一旦新的序列被确认,与新获得序列的 3′端杂交的寡核苷酸就能合成,并能以之为引物进行下一轮的双脱氧测序反应。这样,从一头开始向另一头或由两头向中间(图 9.22),序列被一步步测定。



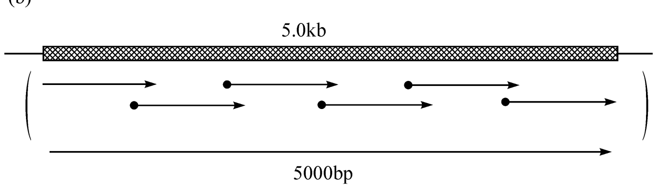


图 9.22　引物步查法

引物步查法相对较慢，因为序列仅可从两头测得，每一步均需要一个测序反应(凝胶电泳)、数据分析、新引物设计和合成。这些过程将至少需要几天时间。如果引物供应不畅，可能所需时间还要更长。该方法适合于短 DNA 片段，不适合于长 DNA 片段，同时不宜自动化处理，因为每一反应均需要一个不同的引物，这些引物将依据上一次反应结果而定。引物步查法成本相对较高，每一步都需要合成一个新引物，这制约了该技术的广泛应用。但是，最近寡核苷酸合成的成本已显著下降，所以成本问题有望解决。该技术的优点在于它的简单，不需要亚克隆或其他一些操作，实际操作时间不多。在其测序过程中，分析者有大量时间可以干其他一些事情。

引物步查法将合成一套覆盖整条序列的测序引物，如果序列需要重复测序，如测定序列突变等位点，这套引物则成为很有用的资源。

3）限制性酶切-亚克隆法

首先需要对目的 DNA 进行酶切分析确定其酶切图谱，再选择适当的限制性内切酶消化 DNA 片段，得到不同长度的限制性酶切(restriction endonuclease digestion)片段，并亚克隆(subcloning) 到测序载体上建立亚克隆库。然后分别测定各个亚克隆的核苷酸序列，通过排列分析，即可获取目的 DNA 的全序列信息。但是这种方法的使用有一定难度，只有在当目的 DNA 片段上的内切酶位点分布比较均匀且目的片段不太长的情况下，可考虑此策略。

参 考 文 献

[1] Mullis K et al. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1986, **51**: 263
[2] Gut M, Leutenegger C M, Huder J B et al. *J. Virol. Methods*. 1999, **77**: 37
[3] Wittwer C T, Herrmann M G, Moss A A. *Biotechniques*. 1997, **22**: 130
[4] Yagi S, Kramer F R. *Nat. Biotechnol*. 1996, **14**: 303
[5] Lowe B, Avila H A, Bloom F R et al. *Anal. Biochem*. 2003, **315**: 95
[6] Maxam A M, Gilbert W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1977, **74**: 560
[7] Sanger F, Nicklen A, Coulson A R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1977, **74**: 5463
[8] 马永平，易发平，宋方洲等. 国外医学(分子生物学分册). 2003, **25(2)**: 115
[9] Colella S, Shen L, Baggerly K A et al. *Biotechniques*. 2003, **35**: 146
[10] Fleischmann R D, Adams M D, White O et al.. *Science*. 1995, **269(5223)**: 496

第 10 章　蛋白质、多肽的氨基酸组成及序列分析

氨基酸是组成肽和蛋白质的基本单位，也是生物体维持生长所必需的营养物质。它们参与机体的代谢过程，具有广泛的生物活性和特殊的生理功能。在对肽和蛋白质的结构和功能进行研究时，往往需要将其进行完全水解，测定其氨基酸的组成。生物体内的游离氨基酸在神经信息传递、代谢的调节以及肽、蛋白质的合成等生理过程中起着重要作用。为了解其生理功能及某些外源性刺激对其功能的影响，也需要对生物体液、细胞或组织内的游离氨基酸进行分析。除了氨基酸总量测定外，往往更需要对个别氨基酸进行分析。常用的氨基酸分析方法可归纳为两类：衍生化间接分析法和无需衍生化的直接分析法。

蛋白质的一级结构即蛋白质中氨基酸的排列顺序，既是研究蛋白质分子高级结构和功能的基础，又有助于蛋白质的基因结构的研究。在某些特定情况下，基因突变常常导致蛋白质中氨基酸的序列发生改变，从而引起功能失调和疾病产生。因此，测定蛋白质的氨基酸序列对新的诊断学方法开发、新的治疗方法建立以及多肽类药物的研究均有重要的意义。

10.1　氨基酸的衍生化间接分析法

无论是游离氨基酸还是水解氨基酸，多数氨基酸都缺少结构检测特征，既无紫外吸收，又无荧光，所以必须使之衍生，转化为具有紫外可见光吸收或能产生荧光的物质才能检测分析。

10.1.1　氨基酸的衍生化反应

为了使测定氨基酸的方法灵敏度高，分辨率好，氨基酸的衍生化是关键步骤之一。近年来人们致力于开发灵敏度高、衍生操作简单、形成的氨基酸衍生物稳定的衍生化试剂。常见的衍生化试剂有茚三酮、邻苯二甲醛（OPA）、丹酰氯（Dansyl-Cl）、异硫氰苯酯（PITC）、氯甲酸芴甲酯（FMOC-Cl）等。

茚三酮在酸性（pH 3～4）和加热条件下与氨基酸反应生成氨、二氧化碳和紫色化合物（最大吸收波长为 570 nm）：

$$+H_2N-C(R)(H)-COOH \longrightarrow + NH_3 + CO_2 + RCHO$$

茚三酮　　　　　　　还原茚三酮

紫色化合物　　　　　　　　(10.1)

除了 α-氨基酸外，其他的氨基酸也可生成有色物质，但无二氧化碳生成。β-、γ-、δ-和 ε-氨基酸比 α-氨基酸反应慢得多，生成的是蓝色物质，而亚氨基酸（脯氨酸和羟脯氨酸）与茚三酮反应形成黄色化合物（最大吸收波长为 440 nm）。氨基酸与茚三酮的反应主要用于柱后衍生，也可用于氨基酸的比色分析，是公认的氨基酸总量的定量方法。在定量分析时，必须除去对测定有干扰的蛋白质、氨和尿素。

邻苯二甲醛（OPA）与巯基试剂（通常为 β-巯基乙醇）连用，在碱性条件下与第一级氨基酸迅速反应生成 1-硫代-2-烷基异吲哚。加成物可产生荧光，在紫外区也有较强的吸收，反应式如下：

$$C_6H_4(CHO)_2 + NH_2CHRCO_2H + R'SH \longrightarrow \text{(1-SR-2-NR-isoindole)} \quad (10.2)$$

该反应不仅适用于柱前衍生，也适用于柱后衍生，它既可进行高灵敏度的荧光检测（$\lambda_{ex}=340$ nm，$\lambda_{em}=450$ nm），检测限达 $10^{-12}\sim10^{-15}$ mol · L^{-1}，也可进行一般的紫外检测（最大吸收波长为 230 nm），检测限达 5×10^{-12} mol · L^{-1}。紫外检测的线性范围为 10～200 pmol，荧光为 0.8～15 pmol，OPA 本身不干扰分离和检测，不必除去过量试剂，色谱图基线也比较平稳。OPA 法主要的缺点是：①亚氨基酸不能与其直接反应，需先氧化（如用次氯酸钠）开环后才能与其反应；②荧光产物不稳定。

丹酰氯在碱性条件下与氨基酸反应生成强荧光物质，它同一级、二级氨基酸都能起反应，但是反应速率比较慢，在室温条件下需 35 min 左右，反应产物的转化率

与反应时间关系较大。反应温度升高可以加速产物转化，但最高不可超过 60℃，否则 Dansyl-Cl 会发生水解，反而使产物转化率降低。

$$HOOC-CH(R)-NH_2 + (H_3C)_2N-C_{10}H_6-SO_2Cl \longrightarrow (H_3C)_2N-C_{10}H_6-SO_2-NH-CH(R)-COOH + HCl \tag{10.3}$$

Dansyl-氨基酸在酸性条件下（pH＝2～3）一般可被乙酸乙酯抽提，大量的 Dansyl-Cl 的反应副产物 Dansyl-OH 留在水相，使干扰因素减小。但是 Dansyl-精氨酸、Dansyl-天冬氨酸、Dansyl-谷氨酸、Dansyl-丝氨酸和 Dansyl-苏氨酸则大部分或部分留在水相，往往会被遗漏，导致错误结论。

Dansyl-Cl 法的检测限与 OPA 法相当，线性范围一般在 15～150 pmol。它的优点是：①衍生物比较稳定，一般可放置 12～24 h；②Dansyl-Cl 胱氨酸衍生物线性关系好，可用于体液中胱氨酸的定量测定。缺点是：①反应时间必须严格控制；②衍生物对紫外光照比较敏感，故反应要在避光条件下进行；③易生成多级衍生物，如赖氨酸、组氨酸、色氨酸可生成二级衍生物。

异硫氰苯酯（PITC）可以和一级、二级氨基酸反应，在室温条件下仅 10 min 即可完成，反应产物具有紫外吸收（最大吸收波长为 254 nm）。PITC 的衍生物单一、稳定，−20 ℃可储存数月，4 ℃水溶液可保存 3 天。此法分析时间短，结果准确，紫外检测限可达 1 pmol。

$$C_6H_5-N=C=S + NH_2-CH(R)-COO^- \longrightarrow C_6H_5-NH-C(=S)-NH-CH(R)-COO^- \tag{10.4}$$

PITC 法最大的缺点就是在氨基酸衍生时需要真空干燥以除去过量试剂。

氯甲酸芴甲酯（FMOC-Cl）能与一级、二级氨基酸的氨基反应，生成的衍生物可用荧光检测（λ_{ex}＝260 nm，λ_{em}＝310 nm）。FMOC-Cl 与氨基酸反应迅速，实温下约 30s 即可完成。此反应产物稳定，在 4℃避光条件下可储存 13 天，在酸性条件下也可稳定 30 h 以上。反应有很高的灵敏度，检测极限为 1 pmol，色谱分离中有很好的分辨率和分离速度。该法最大的优点是不受样品基质的干扰。

$$\text{FMOC-Cl} + NH_2-CH(R)-COO^- \longrightarrow \text{Fmoc}-CH_2-O-C(=O)-NH-CH(R)-COO^- \qquad (10.5)$$

FMOC-Cl 法最大的缺点是：①与 His 形成单、双衍生物的比例不稳定，影响定量；②FMOC-Cl 在衍生过程中易产生试剂的水解反应，过量的 FMOC-Cl 及其水解产物均有和 FMOC-氨基酸类似的荧光。一种方法是可用戊烷抽提去除水解产物的干扰，但抽提效率约为 70%，只能除去部分干扰；另一种方法是采用 1-氨基金刚烷与过量的 FMOC-Cl 试剂反应，生成的衍生物可在全部氨基酸衍生物之后出峰，排除了试剂峰的干扰。

2，4-二硝基氟苯（FDBN）在碱性条件下（pH＝9.5）与氨基酸或肽的游离氨基反应生成黄色的二硝基苯酚（DNP）的衍生物。此反应速率较慢，在 50℃暗处需要 60 min 左右。DNP-衍生物在避光条件下比较稳定，在室温避光条件下可保存 7 天，在 4℃条件下可保存 30 天。FDBN 能与一级、二级氨基酸反应，DNP-衍生物的检测波长为 360 nm，最小检出量可达 10 pmol。不足之处是其与谷氨酸的衍生化反应较慢。

$$O_2N-C_6H_3(NO_2)-F + NH_2-CH(R)-COOH \longrightarrow O_2N-C_6H_3(NO_2)-NH-CH(R)-COOH + HF \qquad (10.6)$$

荧光胺本身没有荧光，但是在碱性条件下，它与伯胺反应形成具有荧光的产物（最大激发波长为 390 nm，最大发射光波长 475 nm）。衍生化产物的荧光强度决定于反应系统的 pH，在 pH＝9 时，荧光最强，而在 pH＝7.4 时只有很低的荧光强度。这一反应在室温条件下几秒内即可完成，而过剩的试剂在几秒钟内就会被分解，不干扰测定。由于荧光胺在水溶液中不稳定，必须用丙酮配制。荧光胺不能与仲胺，如脯氨酸和羟脯氨酸反应，除非它们与 *N*-氯代琥珀酰亚胺作用转变为伯胺。

$$R-NH_2 + \text{荧光胺} \longrightarrow \text{荧光产物} \qquad (10.7)$$

伯胺　　荧光胺(无荧光)　　荧光产物　　(10.7)

蛍光黄异硫氰酸苯酯(FITC)在 pH 9～10 与一、二级氨基酸在室温条件下避光反应 12 h,生成具有荧光的产物(最大激发光波长为 490 nm,最大发射光波长为 518 nm)。过量的试剂不干扰分离,反应液可直接进样分析。衍生化产物单一、稳定,在室温条件下可放置一天。

FITC + 氨基酸 → FIC-氨基酸　　(10.8)

6-氨基喹啉基-*N*-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯(ACQ)在 pH 8.2～10.0 与一、二级氨基酸迅速反应(除了 Tyr 需加热到 50℃),生成的衍生物具有紫外吸收(最大吸收波长为 248 nm)和荧光($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 245 nm /395 nm),过量的试剂将快速水解,衍生化产物单一、稳定,在室温条件下可放置一周,在 4℃条件下可保存两周。反应液可直接进样分析。紫外检测的检测限可达 pmol,荧光检测的检测限可达 40 fmol。

氨基酸 + ACQ → 衍生氨基酸 + NHS　　(10.9)

ACQ $\xrightarrow{H_2O}$ AMQ + NHS + CO_2　　(10.10)

N-羟基琥珀酰亚胺-3-吲哚乙酸酯(SⅡA)是一种较新的衍生化试剂,在 pH 8.0～9.5 和室温条件下与一、二级氨基酸反应 1 h 左右(低温对该衍生反应有利,但温度太低,反应时间过长),生成荧光衍生物($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 278 nm / 355 nm)。过量试剂不需预先除去,干扰较小,反应液可直接进样进行色谱分析,检出限可达 pmol 级。

氨基酸 + SⅡA → 衍生氨基酸 + NHS

(10.11)

还有一些其他的衍生试剂，如 3-对羟基甲酰喹啉-2-甲醛(CBQCA)，试剂本无荧光，在 pH 9 左右与一级氨基酸反应生成稳定的强荧光吲哚衍生物($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 450 nm/550 nm)，在冰箱中可保存 2 周。最低检测限可达 5 fmol 级。*N*-羟基琥珀酰亚胺-α-萘乙酸酯(SINA)，pH=8.9 时与一、二级氨基酸在室温条件下反应 45 min 生成具有紫外吸收(λ_{max}=280 nm)的衍生物。该衍生物稳定，检测限可达 pmol 级。4-氟-7-硝基苯并-2,1,3-噁二唑(NBD-F)在 pH 8、60℃条件下与一级和二级氨基酸反应 2 min，然后将 pH 调至 1 生成强荧光衍生物($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 470 nm / 530 nm)，最低检测限可达 fmol 级。

10.1.2 氨基酸的毛细管电泳分析法

毛细管电泳法(CE)具有微量、灵敏和柱效高的特点，适合于复杂样品中的氨基酸分析。用于氨基酸分析的毛细管电泳主要采用两种分离模式：毛细管区带电泳和胶束电动毛细管电泳。分离各种氨基酸衍生物的缓冲液常为磷酸、硼酸或混合液，也可在 SDS 胶束溶液中加入甲醇、四氢呋喃或尿素等以改善分离度。除了可进行柱前氨基酸衍生化，还可以进行柱内和柱后衍生化。检测方式可用 UV 检测，但大部分采用激光诱导荧光检测(LIF)，激发/发射波长常用 325 nm/ 550 nm 和488 nm/525 nm，可检测到 amol 甚至 zmol 水平的量。可用于测定肽或蛋白质经 Edman 降解后的氨基酸以及生理氨基酸。

人体体液中生理氨基酸的水平及其改变，不仅受年龄营养状况的影响，而且与某些疾病如肝病、肾病以及先天遗传代谢性疾病等密切相关。为了研究不同疾病状况下氨基酸的代谢情况，需要一种快速测定氨基酸的方法以满足其需要。以区带毛细管电泳为分离模式的高效毛细管电泳为快速测定血清中的氨基酸提供了有效手段[1]，见图 10.1。

样品预处理：0.5 ml 血清加内标(10 mmol · L^{-1} D-正白酸)20μl、乙腈 1.5 ml，涡旋 30s，放置 10 min 后，15 000 *g* 离心 10 min，上清液备用或置于−20℃保存。

衍生化：待测标本的上清液或氨基酸的标准溶液 1 ml，加 0.5 mol · L^{-1} pH 9.5 硼酸钠缓冲溶液 1 ml、乙腈 1 ml、FDBN 20μl，摇匀，在 50℃水浴加热 40 min。

分离条件：①操作缓冲液的组成：0.03 mol · L^{-1} pH 9.8 四硼酸钠缓冲液：

异丙醇∶30% Brij=825∶150∶25;②开口石英毛细管:总长度为 370 mm,有效长度为 300 mm,内径为 75μm;③电压:28 kV;④温度:15℃;⑤进样:压力进样 5 s;⑥UV 检测波长:360 nm。

该方法在 8 min 内可分离血清中的 16 种氨基酸,如图 10.1 所示,氨基酸的线性范围 10～700 μmol·L^{-1},最低检测限为 2.5～7.9 μmol·L^{-1},回收率为 86.3%～107.4%。

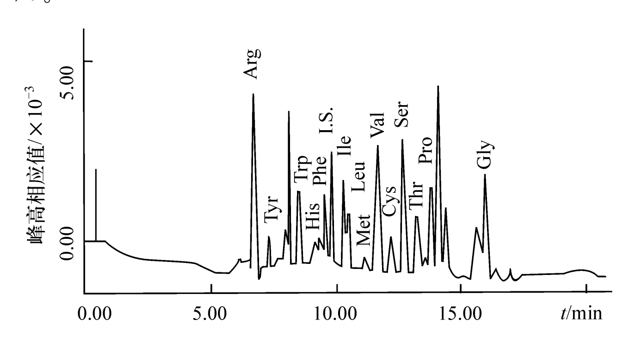


图 10.1　人血清中氨基酸和内标的毛细管电泳图谱

利用 FITC 柱前衍生-毛细管电泳-激光诱导荧光测定大鼠大脑皮质氨基酸类神经递质含量,如图 10.2 所示,可用于研究大鼠脑缺血时黄芩苷的药理作用。结果显示大脑缺血时,大脑皮质的 Glu、Asp、GABA 和 Gly 浓度升高,而黄芩苷可降低 Glu 和 Asp 的浓度,对脑缺血有保护作用[2]。

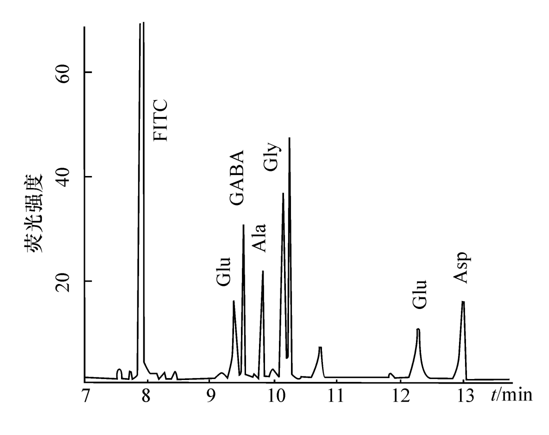


图 10.2　对照大鼠大脑皮质匀浆的毛细管电泳图谱

样品处理:取大鼠大脑皮质绞碎,以 5∶1(W/V)的比例加入 15 mmol·L^{-1} pH 9.2 硼酸缓冲液匀浆20 min,然后加入等体积的氯仿剧烈振摇 15 min 去蛋白,20 000 r·min^{-1}离心 20 min,取上清液衍生化(或在-70℃保存)。

衍生化:50 μl 去蛋白的样品,加 400 μl 的硼酸缓冲液(5 mmol·L^{-1},pH 9.6),再加 50 μl 90 mmol·L^{-1} FITC 丙酮溶液,在 20 ℃避光反应 16 h,进样前用操作缓冲液 10 倍稀释。

分离条件:①未涂渍石英毛细管柱:总长度为 570 mm,有效长度为 500 mm,

内径为75 μm;②毛细管的平衡:在用操作缓冲液冲洗前用0.1 mol·L^{-1} NaOH和去离子水冲洗;③操作缓冲液:15 mmol·L^{-1} pH 9.2硼酸缓冲液;④电压:17.5 kV;⑤温度:25℃;⑥进样:压力进样5s;⑦检测器:488 nm Ar^{+}激光诱导荧光检测。

该方法6种氨基酸的检测限为$2.1\times10^{-11}\sim6.3\times10^{-10}$ mol·L^{-1},回收率为97.1%～102.6 %,是一种快速、有选择性和灵敏的测定大鼠大脑皮层氨基酸类神经递质含量的方法。

10.1.3　氨基酸的反相高效液相色谱分析法

反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分析衍生化的氨基酸混合物具有分析时间较短、方法灵活多样、灵敏度高的优点。氨基酸进行柱前衍生的关键在于衍生剂的选择,选择标准是:能与各氨基酸定量反应,每种氨基酸只生成一种衍生物且有一定的稳定性,操作简便,不产生或易于排除干扰物,色谱分离的分辨率高,检测灵敏度高,分析时间短,便于实现自动化或使衍生物能在不同型号的高效液相色谱仪上测定。

衍生后的氨基酸一般在高效烷基键合C_{18}或C_8柱上,根据液液分配原理进行分离。流动相多以乙酸盐或磷酸盐缓冲液为主,乙醇、甲醇或四氢呋喃为调节剂。由于氨基酸衍生物仍保留着两性混合物的特点,故除改变调节剂外,还可通过调节缓冲液的pH、离子强度、柱温等使之达到理想的分离。当然,不同衍生物所选用的柱型、流动相以及氨基酸的洗脱时间和顺序不尽相同。柱前衍生反相高效液相色谱法可用于分析蛋白质水解液、生理体液和食品等样品中的氨基酸。

利用OPA柱前衍生-反相高效液相色谱分离-荧光检测的分析方法测定大鼠脑组织中分区氨基酸类神经递质含量,如图10.3所示。结果可见兴奋性氨基酸,尤其是谷氨酸在脑内的含量相对较高[3]。

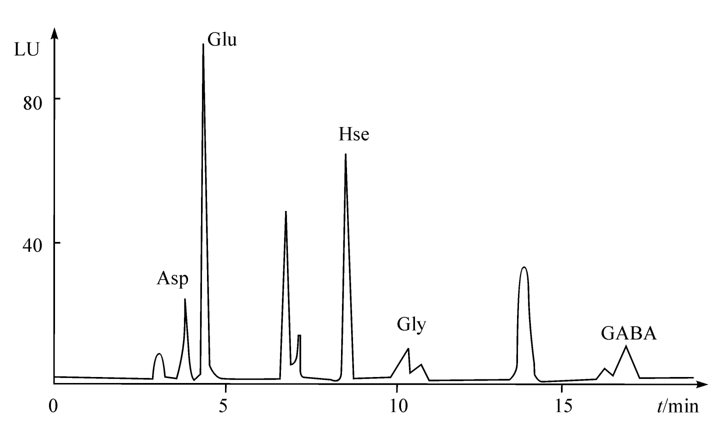


图10.3　大鼠大脑海马的氨基酸的色谱图

样品预处理：分别取大鼠大脑皮质、海马、小脑和纹状体，以 1∶9 的比例（W/V）加入生理盐水，手动玻璃匀浆器冰浴匀浆；匀浆液在 3000 r·min^{-1} 4℃低温离心15 min；取上清液 0.5 ml，加 0.4 mol·L^{-1}高氯酸 1 ml 去蛋白，同时加内标高丝氨酸液（Hse，1 mmol·L^{-1}）50 μl，混匀，3000 r·min^{-1} 4℃ 低温离心 15 min；取 0.5 ml 上清液，加 2 mol·L^{-1} K_2CO_3 溶液 1 ml，用 0.1 mol·L^{-1} K_2CO_3 溶液稀释到 5 ml，14 000 r·min^{-1} 4℃ 低温离心 20 min，取上清液衍生化。

衍生化反应：将 13.4 mg OPA 溶于 1 ml 无水乙醇中，加入 20 μl β-巯基乙醇，再加 4 ml 0.1 mol·L^{-1}硼酸缓冲溶液（pH 9.6），每日补充 20 μl β-巯基乙醇以维持巯基强度，可使用 1 周。预处理好的样品 40 μl 加入 OPA 衍生液 20 μl 轻轻混匀，室温静置 2 min，进样 20 μl。

分析条件：色谱柱为 Hypersil ODS-3（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相：磷酸二氢钾缓冲液（0.1 mol·L^{-1}，pH 6.0）∶甲醇∶乙腈体积比为 6∶3∶1，流速 1 ml·min^{-1}，柱温 40℃，荧光检测激发波长为 340 nm，发射波长为 455 nm。

这几种氨基酸在 0.5～40 μmol·L^{-1}范围内相关系数在 0.997～0.999，具有较好的线性关系。当信噪比为 3 时，各氨基酸的最小检测限在 0.01～0.02 μmol·L^{-1}。

10.1.4 氨基酸分析仪

早在 20 世纪 40 年代初，人们便开始用色谱法分析氨基酸。第一台氨基酸分析仪是由 Spackman、Stein 和 Moore 在 1958 年以离子交换色谱仪为基础建立的。此后，该类仪器在关键部件以及分析速度、灵敏度和自动化程度上都得到了突飞猛进的发展。至 80 年代，一个蛋白质水解液分析只需 30 min，灵敏度可达 pmol 级。80 年代后液相色谱、特别是键合反相分配色谱及柱前衍生技术的发展又给氨基酸分析仪的发展注入了新的生机与活力。目前，离子交换色谱在氨基酸分析中仍占主导地位，被国内外公认为最准确可靠的分离测定手段，而柱前衍生高效液相色谱法也已成熟，进入了实用阶段。

1. 离子交换色谱氨基酸分析仪

离子交换色谱氨基酸分析仪又常被称做专用（自动）氨基酸分析仪。其基本原理是：先将氨基酸混合物在离子交换树脂柱上分离，然后将分离的氨基酸衍生，根据衍生产物的特性选择适当的检测器检测，并进行定性、定量分析。

1）离子交换树脂

专用氨基酸分析仪都是以磺酸型强酸性阳离子交换树脂为柱填料的，该树脂又是由苯乙烯和二乙烯基苯聚合后磺化而成的。苯乙烯是主要成分，二乙烯苯是

交联剂，离子交换的活性基团——磺酸根即联在苯乙烯乙烯基的对位上。交联剂的百分含量(交联度)影响着树脂内部网状结构的孔径大小，交联剂多，分子结构紧密，孔径就小，适合分离相对分子质量较小的离子。反之，交联剂少，网状结构孔径大，适合分离相对分子质量大的离子。一般氨基酸分析仪采用的离子交换树脂交联度多为 8%～12%，目前各国各厂商的离子交换树脂因所用的二乙烯基苯的纯度、类型（如邻、对位异构体等)、磺化程度及其范围不同而不尽相同，但均是球状的，粒度一般在 5～10 μm。

2）分离

氨基酸属两性电解质，其所带电荷随 pH 或离子强度而改变。在酸性溶液中(即 pH 在等电点以下时)，氨基酸呈正离子态，可被离子交换树脂表面的磺酸基团所吸引而附着在树脂上，随 pH 上升或离子强度增大，吸引力即会下降乃至消失而被洗脱下来。不同的氨基酸等电点、极性及分子大小不同，洗脱顺序也不相同。一般酸性的和带羟基的氨基酸先被洗脱下来，然后是中性氨基酸，最后是碱性氨基酸。在同类氨基酸中，短碳链小分子的先洗脱出来，长碳链大分子的后洗脱出来(如甘氨酸先于丙氨酸、缬氨酸先于亮氨酸)。而碳原子数相同的氨基酸，有支链的先洗脱出来(如异亮氨酸先于亮氨酸、亮氨酸先于正亮氨酸)，碳链上的羟基基团可加速洗脱(如丝氨酸先于丙氨酸、羧脯氨酸先于脯氨酸、酪氨酸先于苯丙氨酸、羟基赖氨酸先于赖氨酸)。

氨基酸分离不仅受离子交换树脂的型号、交联度和粒度的影响，还受色谱柱的长度、截面积、柱温和洗脱缓冲液的阳离子类型、pH、离子强度、淋洗梯度、流速以及其中有机溶剂含量的影响。特别需要指出的是洗脱液的阳离子类型，如 Na^+ 型缓冲液变化 pH 和离子强度等，虽能很好的分离各种蛋白质水解氨基酸，却不能将天冬酰胺、谷氨酰胺和一些相关的氨基酸分离开来。因此，在生理体液分析中除要改变柱长、调节柱温外，还必须将 Na^+ 缓冲体系改换成 Li^+ 缓冲体系。

3）衍生与检测

常用的衍生法是茚三酮法(紫外检测)和邻苯二甲醛法(荧光检测)。

4）仪器的结构与流程

典型的氨基酸分析仪如日立(Hitachi) 835 或 Beckman 121 MB 等一般采用 3～5种不同 pH 的缓冲液。缓冲液经加热脱气后，按时间切换，顺序用泵输送到色谱柱上，使由进样系统定量注入的氨基酸混合物逐步分离。分离后的氨基酸与另一台泵输送出的茚三酮混合，经反应槽加热完成衍生，进入紫外可见光分光光度计

检测。或者分离后的氨基酸先与次氯酸钠混合，氧化开环后与 OPA 反应，以荧光计检测。检测后得到的信号，经放大后再送至记录仪、积分仪或其他数据处理系统。如图 10.4 所示。

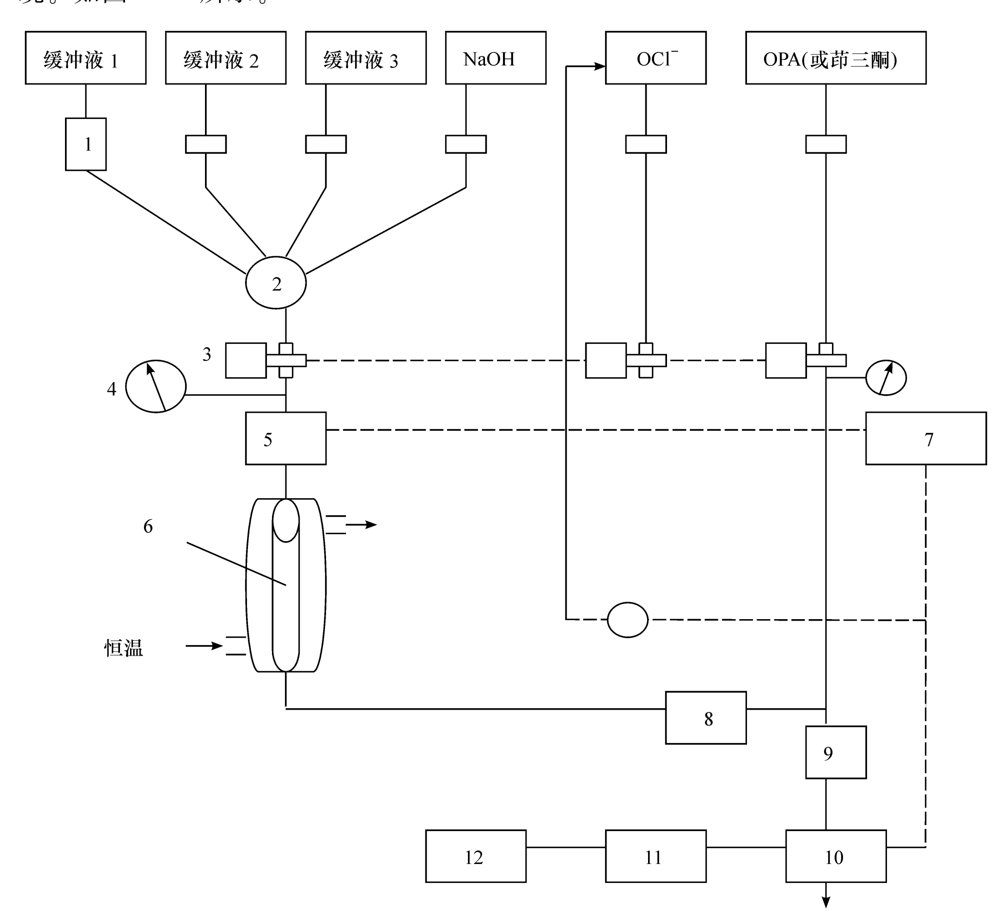


图 10.4　氨基酸自动分析仪的基本结构与流程

1. 缓冲液脱气系统；2. 缓冲液选择阀；3. 泵；4. 压力表；5. 进样器；6. 色谱柱；7. 程序仪；8. 混合室；9. 反应器；10. 荧光计或光度计；11. 记录仪；12. 积分仪

目前生产的氨基酸分析仪多是单柱的。色谱柱有不锈钢或玻璃的，内径1.75～5 mm，柱长 15～30 cm。由于氨基酸的最佳分离在适当的温度(30～37℃)才能获得，故色谱柱通常都装有循环水的夹套，由水浴的循环水控制温度在±0.5℃。

专用型氨基酸分析仪的发展主要体现在柱系统的变化和仪器的自动化、电脑化。柱系统的变化首先体现在树脂粒度的变化上，已从 20 μm 缩至 3 μm。其次，它的内径缩小，从 6 mm 降至 3 mm 乃至 1.75 mm，加之高压泵的设计利用及显色

温度的提高，使分析灵敏度和速度均有了较大的提高，灵敏度以由nmol级降至pmol级，分析速度提高了5～8倍。仪器的全自动化和电脑化使操作更加方便。

2. 反相色谱氨基酸分析仪

专用氨基酸分析仪发展到20世纪80年代中期，其分析速度与灵敏度进一步的提高，受到树脂粒度及柱后衍生等问题的严重制约。然而反相键合色谱和柱前衍生技术的发展给氨基酸分析开辟了另一领域。反相色谱分析仪与专门的氨基酸分析仪相比，更灵敏(可达fmol级)、快速(完成一个蛋白质水解液分析仅需13～30 min)、投资少且可一机多用，目前有不少厂家推出了配套的技术与仪器。

1) 仪器结构

反相分配色谱测定氨基酸可分为在线衍生和机外衍生两种类型，但无论哪种类型所用仪器均为通用高效液相色谱仪。一般说来，只要有二元泵、高效柱(粒度3～4 μm，理论塔板数>70 000)，能进行梯度淋洗并有适当的检测器(紫外可见光或荧光光度计)即可。

表10.1　柱前衍生HPLC各衍生方法的比较

参数	OPA	FMOC-Cl	PITC	FDNB	Dansyl
衍生时间/min	<1	<1	1～10	60(60℃)	>30
衍生物稳定性	低	高	高	高	较高
与二级胺反应	不	能	能	能	能
衍生操作	很简单	较复杂	较复杂	较复杂	简单
去除过量抽干	不必	不必	需要	需要	不必
试剂　溶剂提取	不必	需要	不必	不必	不必
干扰性副反应	无	无	无	有	有
色谱分析蛋白水解液	20	25	20	30	20
时间　生理体液	50	70	60	60	60
检测方法	荧光/紫外	荧光/紫外	紫外	紫外	荧光
灵敏度	fmol	fmol	pmol	pmol	pmol
线性范围/pmol	0.3～15	0.1～5	50～200	5～200	15～150
	0～200	5～200			
CV/%	0.4～2.2	1.9～4.6	2.6～5.5	1～3.2	1.5～4.1

表10.1列出了一些常用的柱前衍生HPLC法的主要特点。目前不同的仪器厂家所推荐配套的方法各不相同。如Agilent和Gilson公司用OPA-FMOC结合

法;LKB 公司则由用户从 OPA、FMOC 和 PITC 等法中任选;Waters 公司使用的是 PITC 法(即 PICO·TAG®方法)和 AccQ·Tag™法。

2) 应用[4,5]

Waters 公司 PICO·TAG®氨基酸分析法是由样品的水解、衍生和分离等条件集结而成的。PICO·TAG HPLC 是由 PICO·TAG®水解衍生工作台和 HPLC 系统构成。PICO·TAG®水解衍生工作台对样品的水解和衍生有良好的效果,可进行水解时的温度控制、样品的干燥、衍生反应试剂的去除、真空操作、氮气置换等工作。以 PITC 作为柱前衍生化试剂,采用反相色谱的原理进行氨基酸分析,分离柱为 PICO·TAG®专用柱,用梯度洗脱的方式洗脱,检测波长为 254 nm,蛋白质水解的 17 种氨基酸可在 12 min 内完成分离,如图 10.5 所示。此外,PICO·TAG®方法灵敏度高,检出限可达 1 pmol。

PICO·TAG®方法测定体液游离氨基酸的方法如下:

(1) HPLC 仪(Waters):510 泵,490E 全波长可见-紫外检测器,PICO·TAG 色谱柱,PICO·TAG 水解衍生装置,810 色谱工作站。

(2) 试剂:

流动相 A:0.07 mol·L^{-1}乙酸钠,2.5 mmol·L^{-1}EDTA,pH 6.5。

流动相 B:乙腈∶水∶甲醇=4.5∶4∶1.5。

内标液:称取蛋氨酸砜 113.2 mg,用 25 ml 0.1 mol·L^{-1} HCl 稀释后,再稀释 10 倍使内标浓度为 2.5 mmol·L^{-1}。

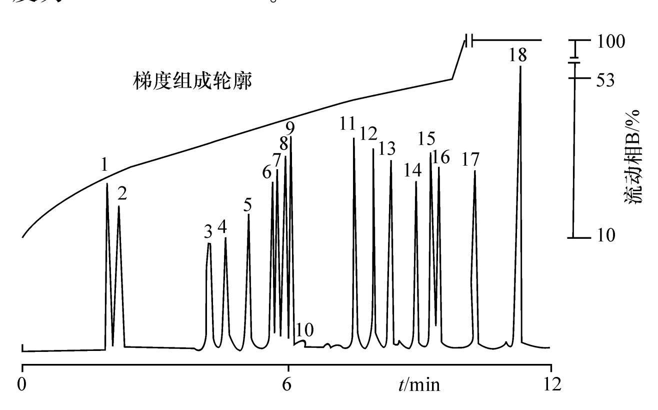


图 10.5 蛋白质水解后 PITC 衍生氨基酸样品 250 pmol 的分离结果

1. Asp; 2. Glu; 3. Ser; 4. Gly; 5. His; 6. Arg; 7. Thr; 8. Ala; 9. Pro; 10. NH_3; 11. Tyr; 12. Val; 13. Met; 14. Cys; 15. lle; 16. Leu; 17. Phe; 18. Lys

衍生试剂:异硫氰酸苯酯∶甲醇∶三乙胺∶水=1∶7∶1∶1,临用前配制。

样品稀释液:取 0.71g 磷酸氢二钠,加超纯水溶解至 1000 ml,用 10 %磷酸-乙

腈液(95∶5)调 pH 至 7.4。

(3) 标准溶液和体液标本的制备：

氨基酸混合标样：分别取 2.5 mmol · L^{-1} 的酸性、中性、碱性氨基酸标样 10 μl,2.5 mmol · L^{-1} 内标液 20 μl,加 0.1 mmol · L^{-1} HCl 100 μl,摇匀。

血清标本：取清晨空腹血 1 ml,离心后取血清 100 μl,加入 20 μl 内标液充分混匀,用离心式超滤法除蛋白,超滤液于 −20 ℃ 保存备用。

(4) 衍生反应：取制备好的氨基酸混合标样或体液标本 20 μl,加入 20 μl 衍生试剂在室温反应 20 min,然后抽干加入 100 μl 样品稀释液,使之充分溶解后直接进样。

(5) 色谱条件：柱温：46 ℃；流速：1 ml · min^{-1}；检测波长：254 nm；进样量：10 μl。进样后按照下列程序进行梯度洗脱：

时间/min	0	13.5	24.0	30.0	50.0	62.5	67.0
A 液/%	100	97.0	94.0	91.0	66.0	0	100

结果表明：该方法可将血清中常见的游离氨基酸分离,如图 10.6 所示。氨基酸浓度在 10～1000 μmol · L^{-1} 时线性关系良好,相关系数在 0.994～0.999。信噪比为 2 时,血清游离氨基酸最低检测浓度为 2 μmol · L^{-1}。

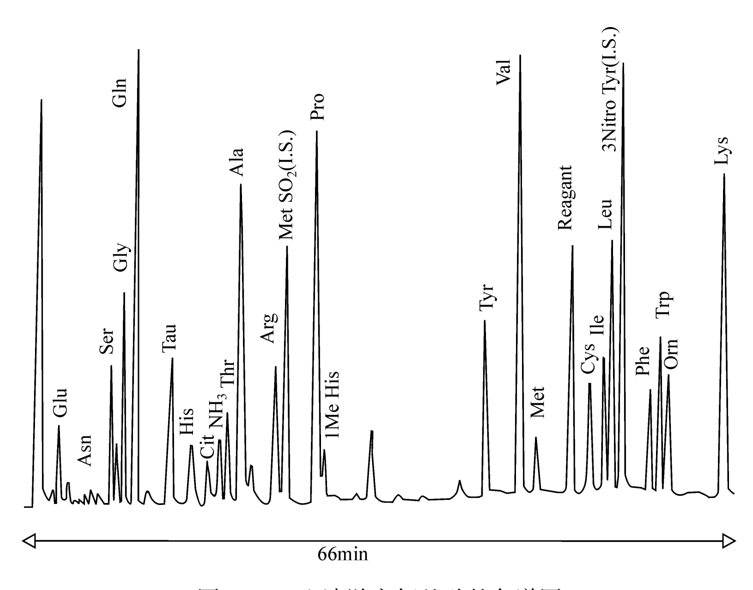


图 10.6　血清游离氨基酸的色谱图

Waters 公司的 AccQ · Tag™ 氨基酸分析法,采用 AQC 作为柱前衍生试剂,比 PICO · TAG® 法快速、灵敏,提高了定量的准确度,水解氨基酸的检测限低于1 pmol。AccQ · Tag™ 氨基酸分析法只需 HPLC 仪和 AccQ · Tag™ 化学包(AccQ · Tag™

试剂盒和 Nova-Pak® C18 4 μm 柱)。采用 AccQ • Tag™ 法分析水解氨基酸如图 10.7 所示。

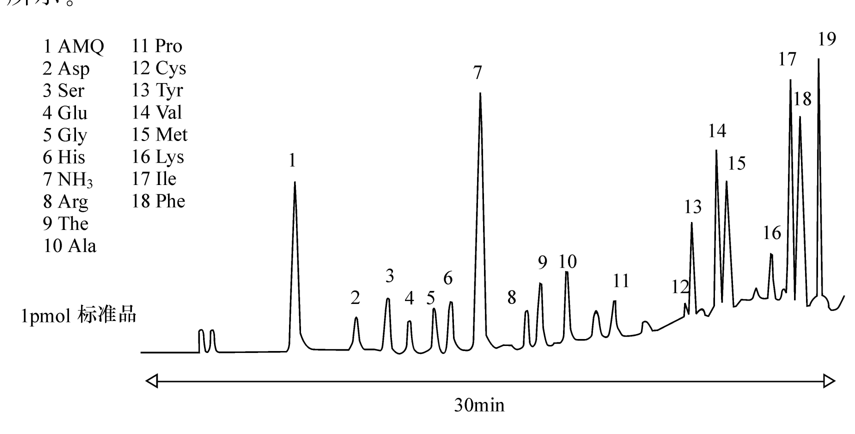


图 10.7　AccQ • Tag™ 法分析水解氨基酸的色谱图

柱:Nova-Pak® C18 3.9mm×150 mm, 4 μm; 柱温:37 ℃;流动相 A: AccQ • Tag™ 流动相;流动相 B:乙腈; 流动相 C: 超纯水; 流速:1 ml • min^{-1}; 梯度:AccQ • Tag™ 方法;检测: 荧光检测激发波长为 250 nm,发射波长为 395 nm

Agilent 公司的氨基酸分析方法,运用了可靠的衍生化反应和分析技术。利用自动进样器实现了在线衍生化与 HPLC 相结合。氨基酸与 OPA 和 FMOC 发生反应,然后进行色谱分析。酸水解后的蛋白质、多肽样品在 pH 10.2 的缓冲液中可以直接衍生化。在 3-巯基丙酸(3-MPA)存在下,一级氨基酸首先与 OPA 反应,二级氨基酸不和 OPA 反应,然后再用 FMOC 进行衍生。加入的吲哚与 3-MPA 相结合可降低氨基酸的疏水性,所以 OPA 衍生化产物比 PMOC 衍生化产物的色谱出峰时间更早。过量的 FMOC 及其降解产物在二级氨基酸后出峰,不会干扰分析,使分析过程快速、准确、灵敏且重现性好。

10.2　氨基酸直接分析法

氨基酸直接分析法是基于阴离子交换分离,积分脉冲安培法检测,不需将氨基酸进行衍生。1999 年,Clarke 等发展了一种积分脉冲安培检测波形。用积分脉冲安培检测的高效阴离子交换色谱,无需衍生,可以直接分离测定氨基酸,对大多数氨基酸的检测限小于 1 pmol,线性范围可以达到 3 个数量级以上。

10.2.1　阴离子交换分离

氨基酸具有两性离子结构,在酸性介质中,以氨基阳离子状态存在;在碱性介质中,以羧基阴离子状态存在,这就是氨基酸直接分析方法的基础。氨基酸直接分

析用薄壳阴离子交换树脂为固定相，阴离子交换树脂含有的碱性基团—$N(CH_3)_3OH$（强碱性）或—NH_3OH（弱碱性）可以解离出 OH^-，能与溶液中的氨基酸阴离子发生交换。氨基酸与树脂的亲和力主要取决于它们之间的静电吸引力，其次是氨基酸烷基侧链与树脂基质聚苯乙烯之间的疏水作用和氨基酸的空间构型。在 pH 12～13 条件下，氨基酸与阴离子交换树脂之间的静电吸引的大小次序是：酸性氨基酸＞中性氨基酸＞碱性氨基酸。因此，氨基酸的洗脱顺序大体是碱性氨基酸、中性氨基酸和酸性氨基酸。

通常使用碱性溶液为流动相，其中氢氧化钠不仅提供洗脱离子 OH^-，而且碱性 pH 条件也是氨基酸在金电极表面进行氧化反应，实现积分脉冲安培检测的必须条件。乙酸根离子（CH_3COO^-）对阴离子交换树脂的亲和力大于 OH^-，是一种较强的洗脱离子，它对极性较小、保留较强的氨基酸起“推”的作用。

10.2.2　脉冲积分安培检测

用于氨基酸检测的安培检测器通常采用金工作电极、Ag/AgCl 参比电极和钛对电极。在 pH 12～13 溶液中，在金工作电极和 Ag/AgCl 参比电极之间施加一个较高的电位，使 α-氨基酸在金电极表面被氧化。大多数氨基酸开始先被氧化为亚胺，然后进一步氧化为腈基化合物，另外，少量的亚胺发生水解生成醛类化合物。反应过程如下：

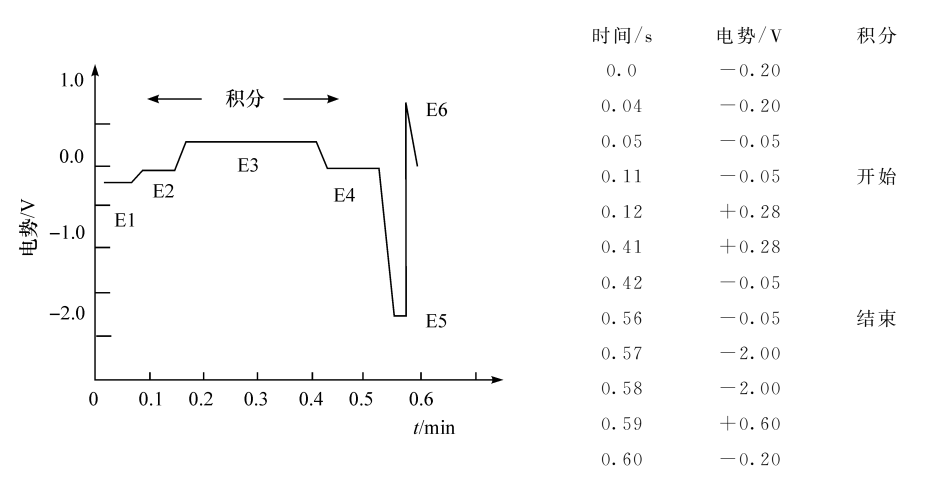
$$R—CH(NH_2)COO^- \longrightarrow R—CH=NH + H^+ + 2e \qquad (10.12)$$

$$R—CH=NH \longrightarrow R—CN + H^+ + 2e \qquad (10.13)$$

$$R—CH=NH + H_2O \longrightarrow R—CHO + NH_3 \qquad (10.14)$$

氨基酸的脂肪侧链抑制氨基酸的氧化反应（如亮氨酸和异亮氨酸），而氨基酸侧链中的羟基（丝氨酸和苏氨酸）、酰胺基（天冬氨酸）和咪唑基（组氨酸）有利于这些氨基酸的氧化反应。在金电极上得到氨基的最大氧化电流所需的电位已超过金表面被氧化的电位。在高电位时，金电极本身形成表面氧化层和氨基酸氧化产物附着，会很快失效。金电极表面氧化时所产生的电流无疑会增加背景和基线噪声以及基线的不稳定性。脉冲电化学检测器解决了这一问题，它是由三个不同的脉冲电位代替直流安培检测器中的加于工作电极上的恒定电位，较工作电位高的正电位用来除去金电极上被测成分的氧化产物。由于金电极本身会部分氧化成氧化金，再加一个大的负电位，使氧化金还原到还原状态。该脉冲每 0.5～1s 循环一次。为此，Johnson 等[6]引入了一种新的技术——积分脉冲安培法。与脉冲安培相似，积分脉冲安培法中加到工作电极上的也是一种自动重复的电位对时间的脉冲电位波形，其不同之处是采样时的电位不是恒定的，而是在高-低值之间扫描。在高电位时，氨基和金的氧化同时发生，在高电位时所形成的氧化金在低电位时被还原，因此由积分整个高-低循环的电流所得到的信号仅仅是被分析成分的信号。

检测氨基酸的积分安培电位波形如图 10.8 所示，由 6 步组成，分为 3 个区。E_1 和 E_2 为吸附/引发区；E_3 和 E_4 为电流积分区；E_5 和 E_6 为清洗/活化区。吸附步骤的施加电压 E_1 一般为负电位，其大小和持续时间影响吸附氨基酸的灵敏度，导致吸附氨基酸和非吸附氨基酸的响应因子的扩大，影响碱性氨基酸的线性范围。必须控制 E_1 的持续时间，一般使其小于 40 ms。E_2 提供一个可以开始积分而氧又不会被还原的电位。开始积分之前在 E_2 的延迟时间允许充电电流减弱，短的延迟时间可减小由于乙酸钠梯度所引起的色谱基线改变以及不同氨基酸响应因子的差距，E_2 的推荐时间为 60 ms。为了获得最高灵敏度，也应为负电位(−0.05 V)，使金电极完全还原，同时氨基酸的吸附在较低的速度下继续进行。开始积分时，第一积分电位 E_3 上升到足以氧化氨基酸和使电极表面被氧化的正电位，应大于 0.20 V，最佳值在 0.25～0.30 V 。受金电极氧化的限制，E_3 电位不宜太高，否则背景和噪声将增加。在第二积分电位 E_4，积分电位由 E_3 降到 E_4（积分开始前的电位），此时氧化金的还原电荷将抵消金氧化的电荷，氧化金的还原比氧化快，为了实现背景补偿，电位 E_4(−0.05 V)的时间不必像电位 E_3 那样长，总的积分时间约为 450 ms(E_3 为 290 ms，E_4 为 140 ms)即可。积分完毕后，立即将电位降至清洗电位 E_5(−2V)，对电极进行清洗，然后迅速升高电位至活化电位 E_6(+0.6 V)，再立即回到初始电位 E_1，从而完成一次积分周期，总的信号值决定于高低电位之间的电流积分值。



时间/s	电势/V	积分
0.0	−0.20	
0.04	−0.20	
0.05	−0.05	
0.11	−0.05	开始
0.12	+0.28	
0.41	+0.28	
0.42	−0.05	
0.56	−0.05	结束
0.57	−2.00	
0.58	−2.00	
0.59	+0.60	
0.60	−0.20	

图 10.8　测定氨基酸的积分安培电位波形图

10.2.3　应用

美国 Dionex 公司的氨基酸直接分析仪的色谱条件如下：

分离柱：AminoPac PA10 (250 mm × 2 mm i. d.)；温度：30 ℃；流速：

0.25 ml • min^{-1}；进样体积：25 μl；检测方式；积分脉冲安培检测器（IPAD），Ag/AgCl 参比电极，金工作电极。水解产物中氨基酸分析的梯度洗脱条件如下：

项目	时间/min	Water/%	0.25 mol • L^{-1} NaOH/%	1.0 mol • L^{-1} CH_3COONa/%	Curve
进样	0.0	90	10		
	2.0	90	10		
	5.0	85	15		8
	8.0	64	36		8
	11.0	64	36		
	18.0	40	20	40	
	21.0	44	16	40	8
	23.0	14	16	70	8
	42.0	14	16	70	8
	42.1	20	80		5
	44.1	20	80		
	44.2	90	10		5
	74.0	90	10		

注：梯度曲线的形状是按照美国 Dionex 公司 GS 50 梯度泵的使用手册 No.031612 第二稿的定义。

此方法已用于分析氨基酸注射液[7]（用去离子水分别稀释 1000 倍，经过 0.45 μm 滤膜过滤），所得色谱图见图 10.9。氨基酸的检出限为 0.3～10.3 pmol，线性范围约为 2 个数量级，样品加标回收率为 88.3%～104.6%。

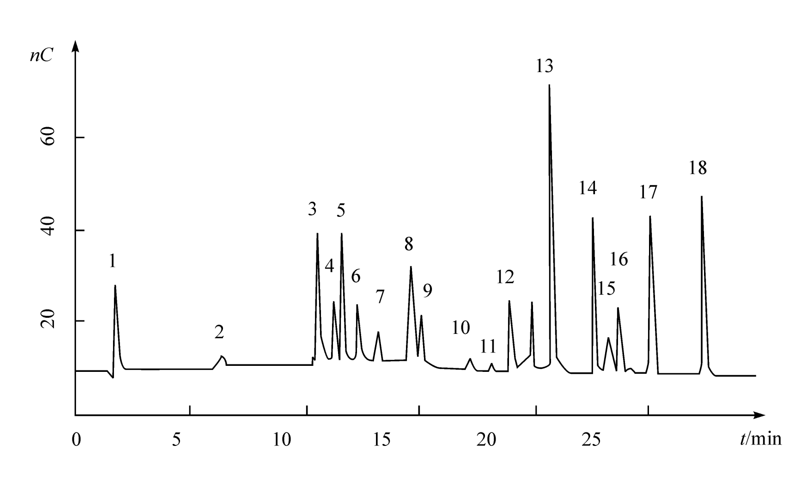


图 10.9　氨基酸注射液样品（稀释 1000 倍）色谱图

1. Arg　2. Lys　3. glucose　4. Ala　5. Thr　6. Gly　7. Val　8. Ser　9. Pro　10. Iso　11. Leu　12. Met　13. His　14. Phe　15. Glu　16 Asp　17. Cys　18. Tyr

10.3　氨基酸的液质联用分析

液质联用技术已成为分离、鉴定各种化合物的重要手段之一。液质联用弥补了传统液相检测器的不足，它集 LC 的高分离能力和 MS 的高灵敏度、高选择性于一体。液质联用技术在分析各种复杂生物基质(全血、血浆、尿、胆汁及生物组织)中的氨基酸时，由于选择性强、灵敏度高，不仅可以避免复杂、烦琐、耗时的样品前处理工作，而且能分离鉴定以往难于辨识的痕量氨基酸。尤其是串联质谱(MS/MS)的应用，通过多反应监测(MRM)，可以大大提高分析的专一性，改善信噪比，提高灵敏度。同时，利用碰撞诱导解离(CID)可将化合物的分子离子或准分子离子打碎，通过中性丢失扫描、母离子扫描和子离子扫描，并与原型氨基酸结构信息相比较，即可鉴定出氨基酸代谢产物的结构。

甲状腺素是碘化酪蛋白的主要活性成分，但甲状腺素并不以游离的方式存在，而是以氨基酸残基或者以某种特殊的方式胶联于碘化酪蛋白中。动物饲喂碘化酪蛋白后能起到间接补充甲状腺素的作用。动物甲状腺分泌的甲状腺素有两种，即：3，3，5-三碘甲腺原氨酸(T_3)和 3，3，5，5-四碘甲腺原氨酸(T_4)。其中 T_3 的活性大约是 T_4 的 5 倍，但含量较小，通常所说的甲状腺素是指 T_4。一碘酪氨酸(MIT)和二碘酪氨酸(DIT)是甲状腺素体内合成的前体物质。碘化酪蛋白是我国禁止在动物饲料和饮水中添加和使用的药物添加剂之一，但缺乏有效的检测方法。由于碘化酪蛋白并不是一种纯物质，直接测定非常困难。在国外衍生气相色谱法和高效液相色谱法都曾依次被用来测定碘化酪蛋白、体液和甲状腺球蛋白中碘化氨基酸(甲状腺素)的含量，但都缺少相应的确证方法。LC/MS 具有灵敏度高，选择性强，分离、定量和确证一次完成等特点。使用 LC/MS 技术，通过分离鉴定试样的水解产物中的三碘甲腺原氨酸和四碘甲腺原氨酸，并以一碘酪氨酸和二碘酪氨酸作为旁证指示碘化酪蛋白的存在，为监测碘化酪蛋白的使用提供了依据。

样品制备：取 100 mg 碘化酪蛋白于聚四氟乙烯消化管中，加入 2 ml 13.5 mol·L^{-1} 的氢氧化钠溶液，于振荡器上轻轻振动使样品被氢氧化钠溶液浸透，然后在 110℃ 烘箱水解 6 h。水解液用等物质的量的乙酸中和，定容于 100 ml 容量瓶中，过 0.45 μm 的滤膜。

采用 Waters Symmetry Shield RP18 (3.9 mm×150 mm，5 μm)，用乙腈 B (0.1%的甲酸)和水 A (0.1%的甲酸)为流动相，0.8 ml·min^{-1} 的流速(柱后分流 0.2 ml·min^{-1} 进质谱)，让 B 从 10%到 50%梯度洗脱 40 min，以选择离子(SIR)检测，见图 10.10[8]。

质谱条件：采用扫描范围 150～900 amu，毛细管电压 3 kV，脱溶剂气 300 L•h^{-1}；采用正离子(ESI^+)式检测，锥孔压为 40 V。SIR 方式检测均采用准分子离子(M+1)作为检测离子。

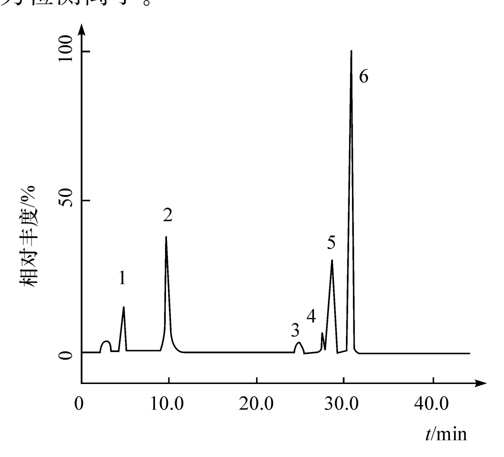


图 10.10　样品的选择离子色谱图

1. 3 -一碘酪氨酸（MIT）；2. 3，5-二碘酪氨酸(DIT)；3. 3，5-二碘甲腺原氮酸（T_2）；
4. 3，5，3′-三碘甲腺原氨酸（T_3）；5. 3，3，5′-三碘甲腺原氨酸（rT_3）；
6. 3，3′，5，5′- 四碘甲腺原氨酸（T_4）

在本实验条件下，各种碘化氨基酸的断裂规律为脱羧、脱氨和脱碘，另外还形成溶剂加合峰，如表 10.2 和图 10.11 所示。其中 T_3、rT_3 的质谱图无法区分，但可从保留时间得以确认。

表 10.2　碘化氨基酸的特征离子峰

碘化氨基酸	特征离子(m/z)				
	加 H^+ $(M+1)^+$	加 H^+加乙腈 $(M+42)^+$	脱氨 $(M-16)^+$	脱羧 $(M-45)^+$	脱氨脱羧 $(M-143)^+$
MIT	308		291	262	164
DIT	434		417	388	290
T_2	526		509	480	382
T_3	652	693	635	606	508
rT_3	652	693	635	606	508
T_4	778	819	761	732	634

以选择离子 m/z 652 和 m/z 778 分别对三碘甲腺原氨酸和四碘甲腺原氨酸进行了测定，并以外标曲线法定量，在样品浓度 2～15 mg•L^{-1} 成线性(R 均大于 0.97)。

许多遗传代谢病与氨基酸代谢异常有关，且常常与多种氨基酸有关。因此，临

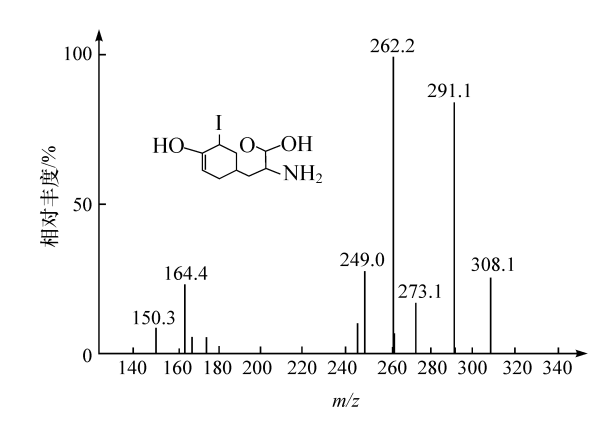


图 10.11　一碘酪氨酸的二级质谱图

床上需要一种能够同时检测血中多种氨基酸及其中间代谢产物的方法，以便应用于疾病的诊断和治疗。如尿素循环障碍、酪氨酸血症等，因缺乏常规的氨基酸分析方法，常常延误诊断和治疗。虽然氨基酸分析仪、高效液相色谱仪和毛细管电泳能够检测氨基酸，但速度慢，测定一个样品需 15～30 min，难于满足大规模的新生儿遗传代谢病筛查需要。液质联用特别适合于临床诊断研究，尤其是疾病的早期诊断，欧美等国已将串联质谱广泛应用于新生儿遗传代谢病的筛查。

液质联用检测氨基酸通常采用盐酸正丁醇使氨基酸及其内标丁酯化。丁酯化的主要目的是使多种丁酯化的氨基酸经过质谱仪时均能够丢失一个质荷比为 102 的中性分子，这样质谱仪通过 *m*/*z* 102 中性丢失扫描方式，可检测到多种氨基酸，利于检测和分析，如图 10.12 所示[9]。但是碱性氨基酸如 Arg、Orn、Cit 和 Gly 经碰撞后，产生的 *m*/*z* 102 中性分子较少，故选用多反应检测方式检测。

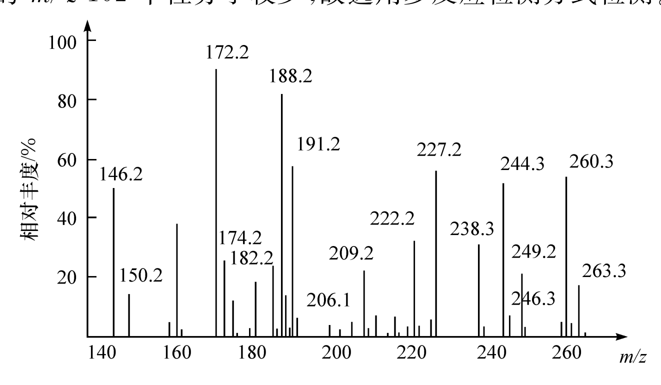


图 10.12　正常儿童氨基酸中性丢失(*m*/*z* 102)扫描质谱图

样品处理法：将 3 mm 干血滤纸片置于 96 孔过滤板中，每孔加入 100 μl 含内标(各自的同位素氨基酸)甲醇液，室温放置 20 min，然后将萃取液离心至 96 孔聚

丙烯板，55 ℃加热吹干，再加入 60 μl 盐酸正丁醇（3 mol · L^{-1}），Teflon 膜覆盖，置 65℃恒温箱内 15 min，55℃加热吹干，再加入 100 μl 80% 乙腈，铝膜覆盖，即可上样检测。

流动相采用 80%乙腈，四元泵流速设置变速：140 μl · min^{-1}，0.2 min ⟶ 30 μl · min^{-1}，1 min ⟶300 μl · min^{-1}，0.2 min，每次取样 20 μl。质谱仪采用两种扫描方法进行检测，中性丢失扫描和多反应检测。中性丢失扫描范围为 *m/z* 140～*m/z* 280，所检测的丁酯化后的氨基酸及其对应的同位素内标质荷比如表 10.3 所示。多反应检测的离子对如表 10.4 所示，用于 Gly、Om、Arg、cit 及其相应内标的测定。

表 10.3　丁酯化后的氨基酸及其对应的同位素内标中性丢失（*m/z* 102）后的质荷比

种类	*m/z*	种类	*m/z*	种类	*m/z*	种类	*m/z*
Ala	146.1	Len	188.2	Phe	222.2	Asp	246.2
D4-Ala	150.1	D3-Leu	191.2	D5-Phe	227.2	D3-Asp	249.2
Val	174.2	Met	206.1	Tyr	238.1	Glu	260.3
D8-Val	182.2	D3-Met	209.1	C6-Tyr	244.1	D3-Glu	263.3

表 10.4　丁酯化后的氨基酸及其对应的同位素内标多反应检测特征离子对

种类	Gly	N1,Cl-Gly	Orn	D2-Orn	Arg	D4,Cl-Arg	Cit	D2-Cit
离子对	132.1/76.1	34.1/78.1	189.2/70.2	191.2/72.2	231.2/70.2	236.2/75.1	232.1/113.1	234.2/115.2

根据质谱峰的 *m/z* 进行定性。定量分析采用内标法定量，即由各种丁酯化的氨基酸及其同位素内标的离子峰强度的比值，以及内标的浓度计算。氨基酸批内和批间变异系数分别为 6.3%～9.7% 、9.9%～14.3%。低浓度回收率为 92%～100% ，中等浓度回收率为 94%～104% ，高浓度回收率为 98%～107%。不同浓度的氨基酸实测浓度与加入浓度之间的相关系数为 0.9990～0.9999。

10.4　氨基酸立体异构体的手性色谱分析

生物体中的氨基酸除甘氨酸外，均具有手性中心，因此都有立体异构体。长期以来，人们认为高等动物体内只有 L-型氨基酸，而 D-型氨基酸只存在于低等物种中，如微生物和细菌。随着分析技术的不断提高和分析方法的发展，近 20 年来，从不同物种的生物体内发现了越来越多的 D-型氨基酸以游离氨基酸、肽和蛋白质的形式存在，这些 D-型氨基酸在动物体内的分布、来源、生理作用及其与疾病的关系倍受关注。例如，在眼的晶体、牙体和髓鞘质中发现有大量的 D-天冬氨酸积聚；健康人的血液中也有极微量的 D-型氨基酸存在，且其含量与年龄相关。老年人比青

年人水平显著增加，提示游离 D-氨基酸与衰老有关。随着研究深入到分子生物学水平，人们发现来自核糖体的肽和蛋白质中有 D-氨基酸残基的存在。这些微量的 D-氨基酸残基的存在被认为是与分子老化现象有关的消旋作用的结果，同时也表明来自核糖体某些特定部位的 D-氨基酸残基的存在为其生物活性所必需的。

人体中存在 D-氨基酸，其含量一般较 L-型低，随着检测技术的不断发展，检测极微量 D-氨基酸已成为可能。对对映异构体的分离要求分离技术具有高灵敏度、高选择性和高分辨率。HPLC 和 CE 是氨基酸手性分析应用最多、最广泛的方法。

10.4.1　氨基酸立体异构体的手性高效液相色谱法分析

高效液相色谱法分离氨基酸的手性对映体通常分为直接法和间接法两大类。直接法是用手性流动相（chiral mobile phase，CMP)或手性固定相(chiral stationary phase，CSP)来拆分对映体；间接法是将对映体混合物以手性衍生化试剂作柱前衍生，形成一对非对映体，然后以反相或正相色谱分离。二者的共同特点是：均以 HPLC 技术为基础，并引入不对称中心；不同的是：直接法是将不对称中心引入分子间，而间接法是将其引入分子内。

1. 直接法

1）手性流动相添加剂法

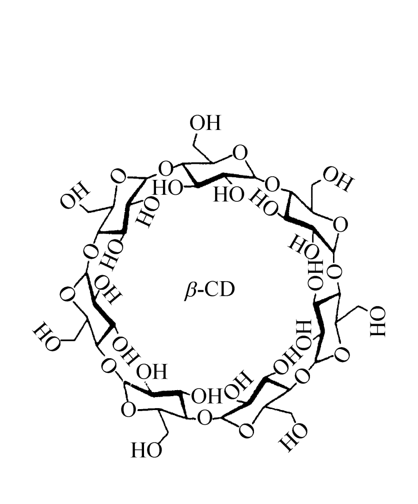
该方法是在流动相中加入手性添加剂(chiral additive，CA)。CA 与对映体通过静电吸引或氢键等非共价结合方式，形成可逆的不稳定的非对映体配合物，在非手性柱上实现氨基酸对映体的拆分。CA 的加入还可以改善溶质的色谱行为，增加检测灵敏度。其优点在于不需要化学衍生，分析过程中较少发生消旋化；不需要特殊的固定相；选择范围较宽。系统平衡时间较长，添加剂消耗较大是其缺点。CMP 添加法按 CA 的类型不同分为以下 4 种：

(1) 配体交换型手性添加剂。手性配体交换络合剂(chiral ligand-exchange complex，CLEC)应用较广泛。CLEC 包括手性配体和二价金属离子，其中，手性配体多为光活性氨基酸(如 L-脯氨酸、L-苯丙氨酸)或其衍生物，二价金属离子是具有空内层 d 轨道的过渡金属离子，如 Cu^{2+}、Zn^{2+}、Hg^{2+}、Ni^{2+}、Cd^{2+} 等。二者形成螯合物，以适当的浓度分布于流动相中，对映体可与之形成三元非对映体配位化合物。由于所形成的非对映体配位化合物的热力学稳定性的差异，导致在固定相上发生立体选择性吸附反应性的差异，使对映体得以分离。使用 CLEC 的研究报告很多，如 Schmid 等[10]将 L-4-羟脯氨酸-铜(Ⅱ)添加到流动相中，分离了甲基化的氨基酸对映体。

(2) 手性离子型络合剂。包括手性离子对添加剂、蛋白质类添加剂、动态手性

固定相、二性配对色谱等。Petersson 等[11]将 20 mmol • L^{-1} 人血清白蛋白(HSA)加于磷酸缓冲液流动相中,以 C2 柱分离了色氨酸对映体,以 C18 柱分离了 2-苯氧基丙酸,均获良好结果。

(3) 基于手性包合作用的添加剂。包合作用是指一种分子被包藏于另一种分子的空穴结构内,形成包合物(inclusion compound)。这种包合物是由主分子(host molecule)和客分子(guest molecule)两种组分组成。环糊精(cyclodextrin, CD)及其衍生物就是一类被广泛采用的主分子。CD 是由多个 D-(+)- 吡喃(型)葡萄糖单元以 α- 1,4-糖苷键首尾相连形成的环状低聚糖,最常见的三种 CD 是 α-、β-和 γ-CD,分别含有 6、7、8 个葡萄糖单元及 30、35 和 40 个手性中心, 如图 10.13 所示。CD 具有中空的截角锥结构,腔内呈相对疏水性,羟基位于腔口处,呈亲水性。环糊精衍生物大多是以甲基、乙基、羟丙基等基团取代环糊精外沿上的羟基氢原子而制备。作为主分子的 CD 及其衍生物分子中,由于每个葡萄糖单元上有 5 个手性碳原子,因此可形成具有特定疏水腔直径及不同亲水性外缘的三维手性环境(手性腔)。当客体分子(如溶液中的氨基酸对映体分子)接近 CD 及其衍生物分子时,只有空间适应性与之吻合的一种对映体分子可以选择性地进入手性腔,形成一种非对映体包合配合物(主-客体配合物)。所以,根据对映体包合常数的差异即可达到手性分离的目的。



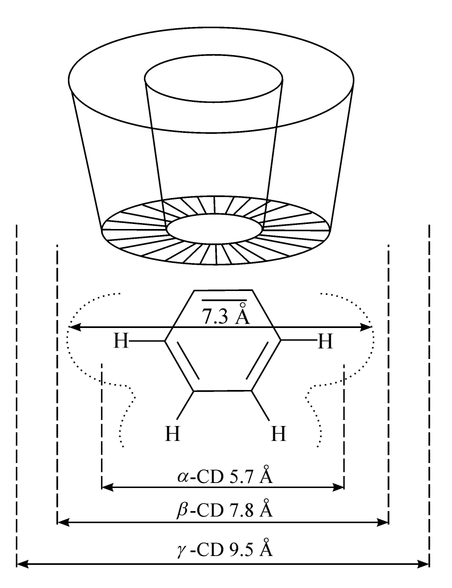


图 10.13　CD 的结构

(4) 其他手性流动相添加剂。如 Dobashi 等[12]利用基于两个氨基酸衍生物的聚集作用形成分子内氢键的分子缔合为手形的识别机制,将 *N*-乙酰基-L-撷氨酸

一叔丁基胺添加于氯仿/正己烷中,在硅胶柱上拆分了各种氨基酸。

2) 手性柱法

将手性化合物键合到固定相表面,使氨基酸对映体与键合的手性分子形成非对映体络合物,由于二者结合能力不同而达到分离目的。手性柱具有广泛的适应性及立体选择性,但通用性差,手性柱价格昂贵。CSP 可分为以下几种类型:

(1) 蛋白质手性固定相。蛋白质具有与小分子可逆性键合的能力,其键合作用均具立体选择性,可用于氨基酸立体异构体的拆分。蛋白质手性固定相的优点是:在键合蛋白质保持其原有的结合能力和流动相不影响其手性作用性质时,通过色谱参数的测定可以推断蛋白质与氨基酸相互作用的信息。使用较多的蛋白质是牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、α-酸性糖蛋白、卵类黏蛋白和胰凝乳蛋白等。

(2) 纤维素和多糖衍生物手性固定相。是含有 D-葡萄糖,通过葡萄糖 1,4-糖苷键形成的具有高度有序螺旋结构的高聚物,葡萄糖中三个羟基可以被衍生化而围绕手性葡萄糖形成链状结构。衍生化的葡萄糖单元可作为手性活性点用于拆分手性对映体,从而使得纤维素和多糖衍生物具有手性分离能力。

(3) 空穴性手性固定相。手性固定相拆分对映体的另一途径是将手性空穴键合到固定相表面,由此产生的客体-主体间的相互作用决定对映体的拆分效果。这一类固定相中键合的手性空穴包括冠醚的分子刻印高聚物和环糊精(CD)。最为常用的是环糊精手性固定相。环糊精的手性识别主要来自环内腔对芳烃或脂肪烃类侧链的包容作用,以及环外壳上的羟基与氨基酸对映体分子发生的氢键作用。这一类固定相还包括 α,β,γ-CD 及其衍生物。α-CD 键合固定相适合于相对分子质量小于 200 的对映体的分析;β-CD 手性键合固定相对形成包合物有最佳大小的内腔,适用于大多数对映体的位阻和电子特征,因此被广为使用;而 γ-CD 键合固定相适用于较大相对分子质量对映体的分析。

(4) Pirkle 型手性固定相。是把具有手性活性的单链分子通过酞胺键连接到丙胺硅胶基团上所生成的手性固定相。其中,固定化的手性基团包括有 π 电子给予或受体的芳香基团以及氢键的偶极叠和的基团。

(5) 配体交换手性固定相。这一类手性固定相拆分对映体与手性配体流动相的拆分机制相同,只是手性配体键合到固定相基质成为手性固定相而已。其配体分子也为具有手性活性的氨基酸(如脯氨酸),金属离子多用 Cu^{2+}。其流动相多用含水流动相,并加入适量螯合的金属离子或配基化合物,以防固定相的流失。

2. 间接法

间接法即为手性试剂衍生化法,它是指对映体在分离前先与高光学纯度衍生

化试剂反应形成非对映体，再进行色谱分离测定。此法要求：①手性试剂及反应产物在化学上和手性上都很稳定，光学性在储存中不发生改变；②在衍生化反应和色谱条件下，试剂、手性化合物和反应产物不发生消旋化反应；③衍生化反应生成的非对映体在色谱分离时应能显示高柱效；④手性试剂应具有 UV 或荧光等敏感结构，能使生成物具有良好的可检测性。间接法分离时可用价廉、柱效高的非手性柱，且反应时可通过选择衍生化试剂来提高检测灵敏度。但是衍生化反应操作比较复杂，同时对衍生化试剂的化学纯度和光学纯度要求也较高。另外对映体与另一个手性分子（即添加的手性试剂）反应的速率不相同，这可能会使生成的非对映体衍生物的比例与对映体的起始比例不同。

氨基酸对映体间接法分离时，常用邻苯二甲醛（OPA）和手性硫醇作为衍生化试剂。手性硫醇种类很多，如 *N*-乙酰-L-半胱氨酸（NAC）、N-乙酰-D-青霉胺（NAP）、D-3-巯基-2-甲基戊酸（MMPA）等。衍生产物在 ODS 柱上分离后用紫外或荧光检测。但不同的手性硫醇将影响氨基酸的洗脱行为，即使用同一种衍生化试剂，洗脱行为也不尽相同。

间接法的例子为采用邻苯二甲醛（OPA）和手性硫醇 *N*-叔丁氧羰基-L-半胱氨酸（Boc-L-Cys）作为衍生化试剂测定鼠脑组织中 D-氨基酸[13]。

样品预处理：海马组织加 20 倍体积的甲醇在冰上匀浆，4500 *g* 离心 5 min。取上清 20 μl 在 40℃蒸干后加 40 μl 0.4 mol·L^{-1} 硼酸钠缓冲液（pH 9.0）、10 μl OPA 试剂溶液（OPA 和 Boc-L-Cys 各 2 mg 溶于 200 μl 甲醇，每日制备），在 25℃反应 2 min 后立即进样 1 μl 分析。

色谱分析条件：分析柱 ODS － 80 TsQA（250 mm×4.6 mm I.D.），柱温 35℃；流动相 A：乙腈-0.1 mol·L^{-1} 乙酸钠缓冲液（pH 6.0）（9∶91，*V*/*V*），流动相 B：乙腈-0.1 mol·L^{-1} 乙酸钠缓冲液（pH 6.0）（19∶84，*V*/*V*），流速 1.4 ml·min^{-1}，线性梯度洗脱 0～35 min，流动相从 A 到 B；荧光检测激发波长为 344 nm，发射波长为 443 nm。

小鼠脑组织中 D-Asp、D-Ser、D-Ala 的线性范围 500 fmol～500 pmol，相关系数 0.999。D-Asp、D-Ser、D-Ala 精密度日间分别为 2.5%、1.6%和 0.9%，日内分别为 4.4%、5.7%和 6.1%。

通过测定缺乏 D-氨基酸氧化酶（DAO）的突变小鼠（ddY /DAO^-）小脑组织中的 D-Asp、D-Ser、D-Ala，发现正常小鼠脑组织中含有少量的 D-氨基酸，而 ddY/DAO^- 小脑中 D-Ser 与 D-Ala 含量明显增加，见图 10.14。

为了研究异亮氨酸的四个立体异构体的体内分布，赵华等[14]建立了用邻苯二甲醛（OPA）和 *N*-乙酰-L-半胱氨酸（NAC）为手性衍生化试剂，柱前手性衍生化-反相高效液相色谱法分离生物样品中异亮氨酸的 4 个立体异构体，并以电喷雾电离质谱（ESI-MS）进行检测的高灵敏度的分析方法。该分析方法对 D-异亮氨酸（D-

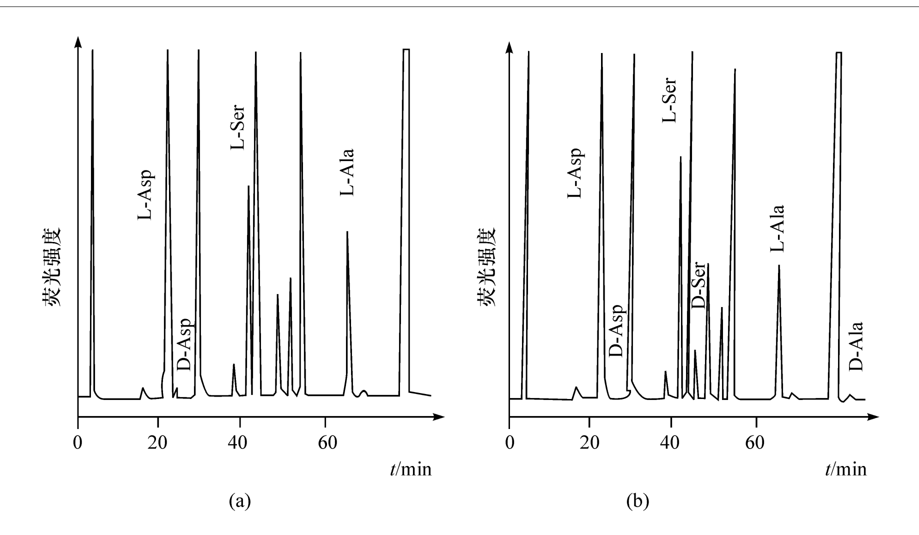


图 10.14　色谱图

（a）正常小鼠；（b）ddY/DAO⁻小鼠

[illegible]、D-别异亮氨酸（D-allo-Ile）和 L-别异亮氨酸（L-allo-Ile）在 5～500 ng 相关系数分别为 0.9967、0.9968 和 0.9993；对 L-异亮氨酸（L-Ile）在 50 ng～5 μg 相关系数为 0.9990。用此方法在正常人血浆中检测出了 L-异亮氨酸（L-Ile）（204±113.8 mg·L^{-1}）和 L-别异亮氨酸（L-allo-Ile）（1.16±0.71 mg·L^{-1}），在正常人尿样中检测出了 L-异亮氨酸（L-Ile）（6.10±2.24 mg·L^{-1}）和 D-别异亮氨酸（D-allo-Ile）（0.53±0.17 mg·L^{-1}）。

3. 柱切换技术

有些 D-氨基酸在生物样本中的含量非常低，需要采用柱的切换技术才能检测。即一微柱用于衍生后样品的富集和纯化，另一手性柱用于分离检测。

采用 ODS 微柱纯化经 4-氟-7-硝基苯并-2,1,3-噁二唑（NBD-F）衍生化 D-和 L-Ala 对映体，再将纯化后的 NBD-Ala 对映体混合物导入手性柱分离检测[15]，可提高 D-Ala 检测的灵敏度，如图 10.15 所示。

样品预处理：海马组织加 20 倍体积的甲醇在冰上匀浆，4500 g 离心 5 min。取上清 20 μl 在 40℃ 减压蒸干后加 20 μl 0.2 mol·L^{-1} 硼酸钠缓冲液（pH 8.0）、10 μl 20 mmol·L^{-1} NBD-F 无水乙腈溶液，在 60℃ 反应 2 min。再加 20 μl 0.5% 三氟乙酸（TFA）溶液，用 0.2 μm 滤膜过滤后进样 1 μl 分析。

色谱分析条件：纯化：微柱 Mightysil RP-18 GP（100 mm×1.0 mm I.D.），流动相为 THF（四氢呋喃）∶TFA∶MeCN∶水（1∶0.02∶10∶89，V/V/V/V），流速 50 μl·min^{-1}。分析柱：Sumichiral OA-2500S（250 mm×4.6 mm I.D.），流

动相为 5 mmol · L^{-1} 柠檬酸甲醇液，流速 0.8 ml · min^{-1}，柱温 40℃；荧光检测激发波长为 70 nm，发射波长为 530 nm。

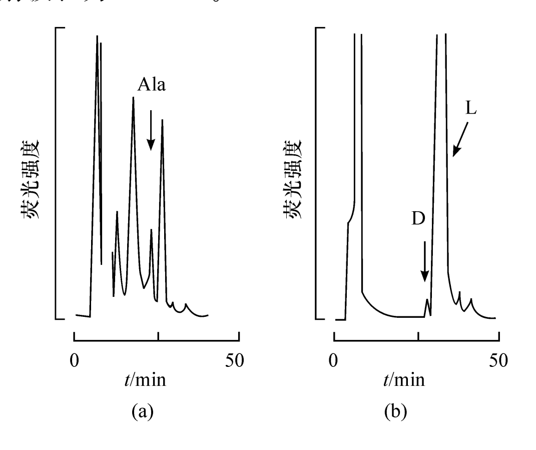


图 10.15 使用柱切换技术分离鼠脑组织中 NBD-D 和 L-Ala 色谱图

(a) 微 ODS 柱；(b)手性柱，峰 D：NBD-D-Ala，L：NBD-L-Ala

小鼠脑组织中 D-Ala 的线性范围为 5～5000 fmol，相关系数为 1.0000，精密度日间和日内分别为 3.9%和 4.8%。

赵华等[16]建立了含有两个手性中心的苏氨酸 4 个立体异构体的分析方法，包括：①用 4-氟-7-硝基苯并-2,1,3-噁二唑(NBD-F)将氨基酸衍生化；②用反相高效液相色谱法分离出苏氨酸和异苏氨酸衍生物(NBD-Thr，NBD-allo-Thr)；③再用手性柱[Sumichiral OA-2500S(250 mm×4.6 mm I.D.，5 μm)]分离 D-苏氨酸和 L-苏氨酸衍生物(NBD-D-Thr，NBD-L-Thr)以及 D-异苏氨酸和 L-异苏氨酸衍生物(NBD-D-allo-Thr，NBD-L-allo-Thr)，并用荧光检测器检测。对该分析方法的线性关系考查结果显示，D-苏氨酸、D-异苏氨酸和 L-异苏氨酸在 0.0025～5 pmol 的相关系数均为 1.000；L-苏氨酸在 0.05～50 pmol 的相关系数也为 1.000。对生物样品进行定量分析的日内及日间精密度大约为 5%。用此方法对大鼠体内 12 种组织和体液中苏氨酸异构体的分布进行了研究，结果在尿样和前脑组织中发现除 L-苏氨酸外(L-Thr)，D-苏氨酸(D-Thr)和 D-异苏氨酸(D-allo-Thr)也同时存在，且 D-异苏氨酸(D-allo-Thr)的浓度高于 D-苏氨酸(D-Thr)。组织和体液中均未检测到 L-异苏氨酸(L-allo-Thr)。在正常人的尿液中也检测到 D-苏氨酸(D-Thr)[(1.33±0.54)μmol · L^{-1}]和 D-异苏氨酸(D-allo-Thr)[(9.54±4.82)μmol · L^{-1}]存在。

10.4.2 氨基酸立体异构体的手性毛细管电泳法分析

毛细管电泳分析氨基酸立体异构体有两种基本策略：一是构建手性分离环境，二是手性消除。

1. 构建手性环境的分离方法

构建手性环境主要使用手性选择剂，将合适的手性选择剂加入缓冲溶液中，手性试剂会与氨基酸对映体之间形成非对映体配合物。因它们的稳定常数不同，有效迁移率也不同，从而达到分离。手性选择性试剂主要有环糊精类化合物、抗生素和表面活性剂等。

环糊精及其衍生物是应用最广泛的手性选择剂。研究表明，在 CD-CZE 模式中，β-CD 比 α-CD 和 γ- CD 具有更高的对映体选择性。但使用环糊精的衍生物时，并不一定符合这一规律，如赵书林等[17]分别使用羟丙基环糊精(hydroxypropyl beta cyclodextrin)HP-α-CD、HP-β-CD 和 HP-γ-CD 作为手性选择剂，研究它们对 D、L-Phe 与 D、L-Tyr 和 D、L-Trp 手性分离的影响。结果发现，只有 HP-α-CD 能使这 3 种氨基酸对映体完全分离。这是由于氨基酸的体积较小，只能与空腔尺寸最小的 α-CD 发生包合作用，形成稳定的包结化合物。另外，HP-α-CD 的手性分离能力优于 α-CD[18]，这可能是由于 α-CD 分子中 2，3，6 位羟基上的氢被羟丙基取代后，CD 疏水性空腔扩大，与氨基酸的尺寸能更好地相匹配。同时，由于取代基的引入，改变了主客体基团之间的相互作用力，从而改善了立体选择性。在 CD-MEKC 模式中，γ- CD 的对映体选择性往往比 β- CD 高。虽然 CD-CZE 是手性分离氨基酸对映体最常用的方法，但是 CD-MEKC 在分离许多氨基酸对映体方面具有明显的优势，胶束的存在可以提高对映体的选择性。此外，一些电荷修饰的 CD 已应用于氨基酸对映体的分离，人们已认识到水溶液中带电荷的 CD 有更好的稳定性，而且通过与带电荷的分析物之间的离子对相互作用使手性识别能力提高，如带正电荷的单一乙二胺-β- CD[19]、两性的 β- CD[20]、带负电荷的磺丁基-β-CD (SBE-β-CD)[19]。这类选择剂的缺点是容易吸附在毛细管壁上而造成分离效率下降。

作为手性选择剂的大环抗生素包括万古霉素、瑞斯西丁素 A、太古霉素等，其中万古霉素是最常用的。万古霉素具有篮状结构，内部有三个大环链(腔体)和两个侧链，它含有 18 个不对称的手性中心和一些功能性基团，如羟基、去氧基、氨基、酞氨基和芳香环，为 *p*-*p* 作用和氢键作用等提供了一个充分的手性环境。大环抗生素对氨基酸对映体有很高的对映体选择性。大环抗生素作为手性选择剂的限制性因素是它在毛细管壁上的吸附会导致分离效率低和迁移时间重现性差[22]。

目前有两类手性表面活性剂已用于氨基酸对映体的分离，即天然的手性表面活性剂及合成的带有长的憎水基和烷基链的吡喃葡萄糖的光学氨基酸的衍生物。第一类主要包括胆盐[23][脱氧胆酸钠(SDC)，牛黄胆酸钠(STC)和脱氧牛黄胆酸钠(STDC)]、洋地黄皂苷和皂角苷[24]，其中 STDC 是最有效的。第二类如

(*S*)和(*R*)-*N*-十二烷基羧基缬氨酸(DDCV)[25]，还有一些手性吡喃葡萄糖为基础的表面活性剂，如十二烷基-β-D-吡喃葡萄糖的磷酸盐和硫酸盐、n-壬基-β-D-吡喃葡萄糖苷(NG)、n-辛基-β-D-吡喃葡萄糖(OG)[26]等。这些表面活性剂的拆分机制是以氨基酸衍生物的憎水基团与胶束中心和手性酰胺基的氢键结合力作用为基础的。另外，手性胶束和 CD 结合使用可以提高手性分离的选择性，使单独使用一种不能达到分离或者是只能部分分离的对映体得到分离。手性胶束同时利用了胶束的手性溶解化作用和非手性分离作用，可以分离许多混合氨基酸的对映体。

2. 手性消除法

手性消除一般采用柱前衍生反应方法，利用手性衍生试剂将氨基酸对映异构体转变为非对映异构体衍生物，即手性消除，然后在非手性条件下进行分离。消除法可将手性消除和检测衍生反应结合考虑，即选用适当的衍生试剂和检测方式，以满足样品测定的需求。手性消除的优点是实验条件的优化相对比较简单，分析速度快。另外，使用(+)和(−)手性选择剂，可以使对映体的出峰顺序发生反转，对氨基酸的混合物有更好的选择性，但是手性衍生试剂的光谱纯度要求高也会使它的应用受到一定的限制。

D-丙氨酸(Ala)、D-谷氨酸（Glu）和 D-天冬氨酸（Asp）是与生命科学密切相关的手性氨基酸，它们相对分子质量均较小且不含苯环，因而手性拆分难度较大。利用荧光素异硫氰酸酯(FITC)进行柱前衍生化的方法，采用 MEKC 分离模式，以十二烷基磺酸钠（SDS）为准固定相，以 β-环糊精（β-CD）作为手性选择添加剂，拆分 D、L-Ala，D、L-Glu 和 D、L-Asp，并以高灵敏度的激光诱导荧光（LIF）检测器进行检测[27]，如图 10.16 所示。

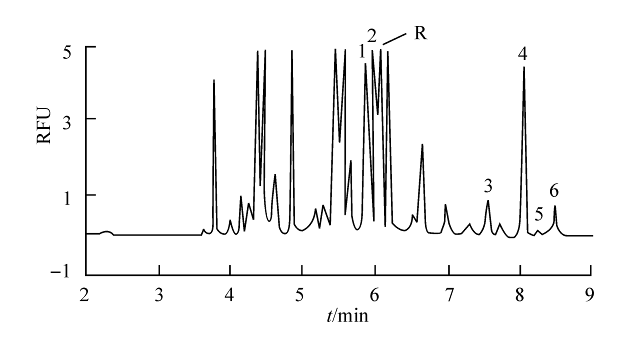


图 10.16　正常大鼠晶体电泳谱图

1. D-Ala　2. L-Ala　3. D-Glu　4. L-Glu　5. D-Asp　6. L-Asp

样品处理：称取 10.00 mg 冰冻保存的大鼠晶体(湿重)匀浆套管，加入 300 μl 40 mmol·L^{-1}硼砂缓冲溶液(pH 9.3)，冰冻匀浆 10 min，将溶液转移至 1 ml 离心管中，用 200 μl 上述缓冲液洗涤匀浆棒和套管，合并溶液，加 1 滴 35 % 高氯酸去蛋白，静置 1 min，1.2×10^4 r·min^{-1}离心 20 min，取上清液，以 1 mol·L^{-1}氢氧化钠调节 pH 为 9.3，经 0.45 μm 滤膜过滤后，进行衍生化。

衍生化：取 50 μl 待测样品，加入 300 μl 2.5×10^{-3} mol·L^{-1}荧光素异硫氰酸酯(FITC)的丙酮溶液，加入丙酮 50 μl，2 滴 0.5%丙酮-吡啶溶液，加入40 mmol·L^{-1} pH 9.3 的硼砂缓冲溶液至 1 ml，在(40.0±0.5)℃下避光恒温 12 h。

分离条件：未涂渍石英毛细管柱：37 cm×50 μm i.d.运行缓冲溶液，其中包含13 mmol·L^{-1}的β-CD、50 mmol·L^{-1}的 SDS，电压为 20 kV，温度为 25℃，以 3.0 kPa 气压进样 5 s，激光诱导荧光(LIF)检测，氩离子激光器，激发波长 488 nm，发射波长 520 nm。

这 6 种氨基酸的线性范围约为 0.050～2.000 mg·L^{-1}，检测限为 0.005～0.050 mg·L^{-1}，回收率为 97.59%～102.8%。该法用于正常组和白内障组大鼠晶体 3 种氨基酸 D、L 含量的分析，结果表明晶体中 D-Ala 含量正常组较白内障组高($P<0.05$)，L-Ala、D-Asp 含量正常组较白内障组低($P<0.05$)，D-Glu、L-Glu、L-Asp 含量两组无显著性差异($P>0.05$)。

10.5　肽和蛋白质的直接测序法

目前，肽和蛋白质的测序有 3 种策略：①根据基因测序的结果，从 cDNA 演绎肽和蛋白质序列。这种策略简单、快捷，甚至可以得到未分离出的蛋白质或多肽的序列信息。但是，用这一策略得到的一级结构不含蛋白质翻译后修饰及二硫键位置等信息。②直接测序策略。③质谱测序与生物信息学搜索相结合的策略。策略①可参考分子生物学的有关专著，策略③将在本书蛋白质组与蛋白质组分析一章中介绍，本章主要介绍直接测序策略。

1953 年，Frederick Sanger 在对牛胰岛素的研究中首先提出氨基酸直接测序的概念，迄今为止，已通过直接测序阐明了几千种蛋白质的氨基酸序列。

在蛋白质序列测定中，因为可以得到的蛋白质样品十分有限，而且蛋白质包含的 20 种不同的氨基酸表现出不同的化学功能和化学活性，在测序过程中每一次变性或裂解所发生的一系列副反应将使测定过程变得十分复杂。在蛋白质序列测定中由于没有类似于 DNA 序列测定中采用的 PCR 技术可应用，因此，与 DNA 序列测定相比，蛋白质序列测定在许多方面要复杂得多。其基本的测序过程如下所述。

10.5.1　确定不同的多肽链数目

首先应该确定蛋白质中不同的多肽链数目，根据蛋白质 N 端或 C 端残基的物

质的量和蛋白质的相对分子质量可确定蛋白质分子中的多肽链数目。如果是单体蛋白质，蛋白质分子只含一条多肽链，则蛋白质的物质的量应与末端残基的物质的量相等；如果蛋白质分子是由多条多肽链组成，则末端残基的物质的量是蛋白质的物质的量的倍数。

10.5.2　肽链的裂解

当蛋白质分子是由两条或两条以上的多肽链构成时，必须裂解这些多肽链。如果多肽链是通过非共价相互作用缔合的寡聚蛋白质，可采用 8 $mol \cdot L^{-1}$ 尿素、6 $mol \cdot L^{-1}$ 盐酸胍或高浓度盐等变性剂处理，使寡聚蛋白质中的亚基裂解；如果多肽链之间是通过共价二硫键交联的，可采用氧化剂或还原剂断裂二硫键，然后再根据裂解后的单个多肽链的大小不同或电荷不同进行分离和纯化。

太长的多肽片段不能直接进行序列测定，一般肽片段长度应为不超过 50 个左右残基的肽段。当肽段超过这个长度时，由于反应的不完全以及副反应产生的杂质积累将影响测定结果，因此，必须通过特定的反应将它们裂解为更小的肽段。通过两种或几种不同的断裂方法（即断裂点不同）将每条多肽链样品降解成为两套或几套重叠的肽段或肽碎片，每套肽段分别进行分离、纯化，再对纯化后的每一肽段进行氨基酸组成和末端残基的分析。

使肽链中某些特殊位置上的肽键发生断裂，可采用化学反应或酶反应裂解产生若干能够进行测序的小片段。一般将蛋白质样品分为两等份，采用不同的试剂裂解产生两套不同的片段，两套片段在测序完成后，根据它们之间的重叠情况即可重新排序。

1. 酶解法

蛋白质通过蛋白水解酶的裂解将产生若干能够代表每个蛋白质特性的肽片段。用于特定的蛋白质裂解的蛋白水解酶包括外肽酶和内肽酶，裂解肽链的 N 端或 C 端的氨基酸可采用外肽酶，而内肽酶则用于切断肽链中某个特定部位。表 10.5 为常用的蛋白水解酶。

表 10.5　用于蛋白质部分裂解的蛋白酶

蛋白酶	酶切位点	
内肽酶：		
胰蛋白酶	R_{n-1} = Arg，Lys	$R_n \neq$ Pro
胃蛋白酶	R_n = Leu，Phe，Trp，Tyr，Val	$R_{n-1} \neq$ Pro
糜蛋白酶	R_{n-1} = Phe，Trp，Try	$R_n \neq$ Pro
内肽酶 GluC	R_{n-1} = Glu	

续表

蛋白酶	酶切位点	
外肽酶：		
亮氨酸氨肽酶	$R_1 \neq Pro$	
氨肽酶	所有 N 端残基	
羧肽酶 A	$R_n \neq Arg, Lys, Pro$	$R_{n-1} \neq Pro$
羧肽酶 B	$R_n = Arg, Lys$	$R_{n-1} \neq Pro$
羧肽酶 C	所有 C 端残基	

具有高度专一性的胰蛋白酶是最常用的内肽酶，当下一个残基不是 Pro 时，胰蛋白酶可催化裂解肽链中羧基端（C 端）带有正电荷的残基（Arg 和 Lys），如式(10.15)。将胰蛋白酶消化所获得的特征片段图谱与数据库进行比较，即可进行蛋白质的鉴定，因而被作为一种对已知蛋白质进行鉴定的方法。

$$H_3\overset{+}{N}-C(=N)-NH-CH_2-CH_2-CH(-NH\cdots)-C(=O)-HN-CH(R)-C(=O)-\cdots$$

精氨酸(或赖氨酸)　　除脯氨酸以外的氨基酸

$$\xrightarrow{\text{胰蛋白酶}} H_3\overset{+}{N}-C(=NH)-NH-CH_2-CH_2-CH(-NH\cdots)-C(=O)-O^- + H_3\overset{+}{N}-CH(R)-C(=O)-\cdots \quad (10.15)$$

在除去裂解位点，即除去 Lys 或 Arg 支链上的正电荷后，这个位点上的肽将不再被胰蛋白酶切断。例如，用甲基马来酸酐衍生 Lys 残基，产生一个不带正电荷的 Lys 支链，则胰蛋白酶不能将其识别作为一个裂解位点，如式(10.16)。而在加上裂解位点，即在其他氨基酸支链上引入正电荷后，会产生一个可被胰蛋白酶识别的新裂解位点。例如，采用 2-溴乙胺使 Cys 发生氨基烷基化反应，在 Cys 支链中引入了一个正电荷，则胰蛋白酶能将其识别作为新裂解位点，如式(10.17)。通过上述两种方式，就能够更充分地发挥胰蛋白酶对蛋白质的裂解特性。

$$\overset{+}{N}H_3-CH_2CH_2CH_2CH_2-\underset{\underset{\vdots}{NH}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots \xrightarrow{\text{甲基马来酸}} \underset{\text{NH}-C(=O)-C=C(CH_3)COOH}{CH_2}CH_2CH_2CH_2-\underset{\underset{\vdots}{NH}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots$$

赖氨酸

(10.16)

$$SH-CH_2-\underset{\underset{\vdots}{NH}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots + BrCH_2CH_2NH_3$$

胱氨酸　　2-溴乙胺

$$\longrightarrow \overset{CH_2CH_2NH_3}{\overset{|}{S}H}-CH_2-\underset{\underset{\vdots}{NH}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots + HBr$$

(10.17)

与胰蛋白酶相比较，内肽酶的专一性略差，所产生的肽片段小，与其他肽片段的重叠程度不够，使肽片段在蛋白质序列中重新排列时的位置则可能发生错误。

对 Arg 和 Lys 含量较高的蛋白质，则可采用限制胰蛋白酶水解的方式。即通过改变反应条件，缩短反应时间，使酶与肽链接触的机会减小，从而获得符合测序要求的肽片段。

2. 化学降解法

许多化学反应也可用于专一性地裂解肽键。例如，为裂解所有 Met 残基，可在温和酸性的反应条件下，采用溴化氰（CNBr）在 C 端对 Met 残基进行专一性的裂解，形成肽基高丝氨酸内酯，如式(10.18)所示。

$$N\equiv C-Br$$

$$CH_2-\ddot{S}-CH_2-CH_2-\underset{\underset{\vdots}{NH}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-HN-\overset{R}{\overset{|}{C}H}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots$$

$$\longrightarrow CH_2—\overset{C\equiv N}{S^+}—CH_2—CH_2—\underset{NH}{CH}—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—H\ddot{N}—\overset{R}{\overset{\|}{C}H}—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—\cdots \quad (+Br^-)$$

$$\longrightarrow \text{(O-ring)}=H\ddot{N}—\overset{R}{\overset{\|}{C}H}—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—\cdots \quad (NH—\cdots) \tag{10.18}$$

$$\xrightarrow{H_2O} \text{(O-ring)}=O + H_3\overset{+}{N}—\overset{R}{\overset{\|}{C}H}—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—\cdots \quad (NH—\cdots)$$

肽基高丝氨酸内酯　　氨酰肽

总的来说，为满足测序的要求，有时需要采用不同的处理方法来进行多肽链的裂解，才能得到足够小的多肽片段。

10.5.3　二硫键的裂解

二硫键(disulfide bond)在两个 Cys 残基之间形成，可出现在一条多肽链中不同的氨基酸残基之间，也可出现在不同多肽链中的氨基酸残基之间。测序之前，必须裂解存在于多肽链中或不同多肽链之间的二硫键以便于分离和展开亚基，同时，蛋白质原有结构的分解也使测序中采用的蛋白质分解试剂能够更好地发挥作用。

裂解反应最好在变性条件下进行，例如，通过加入盐酸胍或 SDS 等变性剂，使紧密结合的蛋白质结构展开而暴露出所有的二硫键，然后加入氧化剂或还原剂使二硫键裂解。

常用的氧化剂是过甲酸，它能使蛋白质中所有的 Cys 残基均被氧化为磺基丙氨酸(无论是否通过二硫键连接)，如式(10.19)。由于磺基丙氨酸在酸碱条件下都稳定，因此可通过产生的磺基丙氨酸数量推断 Cys 残基总量。

$$\cdots—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—\underset{\underset{\vdots}{NH}}{CH}—CH_2—S—S—CH_2—\underset{\underset{\vdots}{NH}}{CH}—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—\cdots$$

胱氨酸

$$\xrightarrow[\text{过甲酸}]{HO—C—\overset{O}{\overset{\|}{O}}—OH} \cdots—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—\underset{\underset{\vdots}{NH}}{CH}—CH_2—SO_3^- + {}^-_3OS—CH_2—\underset{\underset{\vdots}{NH}}{CH}—\overset{O}{\overset{\|}{C}}—\cdots \tag{10.19}$$

磺基丙氨酸

该方法的明显缺点是过甲酸会导致 Met 残基氧化为甲硫氨酸亚砜和砜，如式(10.20)，也可使 Trp 残基的吲哚侧链部分降解。

$$\underset{\text{蛋氨酸}}{CH_3-S-CH_2-CH_2}-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots \xrightarrow[\text{过甲酸}]{HO-C-\overset{O}{\overset{\|}{O}}-OH} CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{\underset{\underset{O}{\|}}{S}}}-CH_2-CH_2-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots \tag{10.20}$$

二硫键也可以用过量的二硫苏糖醇（DTT）或巯基乙醇还原为巯基，如式(10.21)、式(10.22)所示。产生的巯基必须用烷基化试剂(例如碘乙酸)处理，以防止二硫键的重新形成，如式(10.23)所示。所产生的烷基化衍生物在后续测序步骤中的肽裂解条件下十分稳定。

$$\cdots-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-\underset{\text{胱氨酸}}{CH_2-S-S-CH_2}-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots+\underset{\text{2-巯基乙醇}}{2HSCH_2CH_2OH}$$

$$\longrightarrow\cdots-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-CH_2-SH\;\;HS-CH_2-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots+\begin{matrix}SCH_2CH_2OH\\|\\SCH_2CH_2OH\end{matrix} \tag{10.21}$$

$$\cdots-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-\underset{\text{胱氨酸}}{CH_2-S-S-CH_2}-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots+\underset{DTT}{\begin{matrix}CH_2SH\\|\\CH_2OH\\|\\CH_2OH\\|\\CH_2SH\end{matrix}}$$

$$\longrightarrow\cdots-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-CH_2-SH\;\;HS-CH_2-\underset{\underset{\vdots}{|}}{\underset{NH}{|}}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\cdots+\text{(HO)}_2\text{-1,2-二硫杂环己烷（环状 DTT，4,5-二羟基-1,2-二噻烷）} \tag{10.22}$$

$$\cdots-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-\underset{\underset{\displaystyle \vdots}{|}}{\underset{NH}{\underset{|}{CH}}}-CH_2-SH+ICH_2OO^- \longrightarrow \cdots-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-\underset{\underset{\displaystyle \vdots}{|}}{\underset{NH}{\underset{|}{CH}}}-CH_2-SCH_2OO^-+HI \tag{10.23}$$

半胱氨酸　　　保护后的半胱氨酸

10.5.4　氨基酸组成分析

在裂解二硫键后，需要对每个多肽链中氨基酸的组成进行测定。一般将分离、纯化后的多肽链样品分为两部分，一部分样品经过完全水解，测定其氨基酸组成，并计算出氨基酸各残基的含量；另一部分样品则进行 N 端或 C 端测序。

一个未知蛋白质的氨基酸组成，可以通过测量氨基酸残基的相对百分比并与数据库进行比较而确定。其测量可通过两个步骤来完成：首先通过酸水解、碱水解或酶水解等方式裂解蛋白质中所有的肽键，继而分离游离氨基酸并进行定量测定。

在二硫键裂解之后，蛋白质不同亚基可通过电泳方法（如 SDS-PAGE）或色谱方法（如 SEC 或 RP-HPLC）等进行分离。由于每一个氨基酸残基具有大约 110Da 的分子质量，根据每个亚基分子质量的大小，即可确定氨基酸残基的数量。以往，一般采用 SDS-PAGE 或 SEC 等方法确定蛋白质的分子质量，而现在生物质谱法因为准确度更高、分析速度更快，越来越被普遍采用。

在酸催化水解中，要寻找理想的水解条件是比较困难的，因为要裂解所有的肽键，必须对氨基酸残基的降解平衡进行综合考虑。一般情况下，不同氨基酸的降解反应在各自不同的条件下进行，实际的氨基酸组成是从不同的降解实验中推断得到的。通常，为防止氨基酸中的硫被空气氧化，在真空条件下对多肽用 $6mol \cdot L^{-1}$ HCl 进行处理，反应混合物需要在 100～120℃保温 24h，而 Leu、Val、Ile 等脂肪氨基酸则可能需要较长的反应时间才能完全水解。但是，在这样的反应条件下，部分氨基酸残基会发生降解，Trp 将被完全降解。此外，在酸催化水解中，Asn 和 Gln 分别转化为 Asp 和 Glu 并消去 NH_4^+。对这些氨基酸，必须测定 Asx（Asn＋Asp）、Glx（Gln＋Glu）和 NH_4^+（Asn＋Gln）的总含量并对它们进行比较。

碱催化水解一般仅用于特殊情况下。多肽在 100℃条件下与 $4mol \cdot L^{-1}$ NaOH 反应 4～8h，Arg、Cys、Ser、Thr 被分解，其他的氨基酸则被脱胺基和外消旋。正因如此，应用碱水解测定 Trp 含量就受到了限制。

由于具有高度的专一性，内肽酶和外肽酶都可用作催化某些肽键水解的酶，Asn、Gln、Trp 等含量的测定常常采用酶法。为保证所有肽键的完全水解，

一般都采用这些酶的混合物进行催化水解。但是酶本身也是蛋白质，在反应条件下也可以发生降解而污染反应混合物，所使用的酶浓度不能过高，大约在1%左右。

上面几种方法都可应用于某些氨基酸的定量测定。但是，要保证使所有的肽键完全水解，而又不引起氨基酸残基的降解，单独采用任何一种方法都不能满足这个要求。因此，要实现多肽中的所有氨基酸的定量测定，可将两种或三种水解方法联合应用。

水解完成后所得到的游离氨基酸混合物采用离子交换色谱或 RP-HPLC 进行分离，然后根据洗脱时间进行鉴定，根据峰面积或峰高进行定量测定。为增加分析的灵敏度，可以采用丹磺酰氯（dansyl chloride）、Edman 试剂（PITC）、邻苯二醛（OPA）及 2-巯基乙醇等试剂对氨基酸进行柱前或柱后衍生化，在形成具有强荧光性的加成化合物之后进行检测，如本章第一节所述。

10.5.5　肽段氨基酸序列的测定

肽和蛋白质序列测定（protein sequencing）直接测序策略的步骤通常包括：第一，采用化学法或酶法从蛋白质多肽链的 N 端或 C 端将氨基酸残基依次从蛋白质或多肽的末端切割下来；第二，对每次切割下来的氨基酸残基进行正确的鉴定。氨基酸残基的鉴定通常采用在氨基酸残基上衍生一个生色基团的方法，利用高效液相色谱法进行分离鉴定。随着生物质谱法、自动化技术和生物信息学的不断发展，尤其是生物质谱法中生物分子的电离技术的改进，使蛋白质序列测定技术已经发生了革命性的变化，蛋白质序列分析的时间大大缩短。

1. N 端序列分析（Edman 降解）

1）Edman 降解分析原理

蛋白质和多肽的 N 端分析可通过与丹磺酰氯、氨肽酶（aminopeptidase）或 Edman 试剂（异硫氰酸苯酯，phenyl isothiocyanate，PITC）的反应进行分析。其中，1950 年由 Edman 公布的氨基酸序列测定技术，即运用苯异硫氰酸酯与氨基酸的反应（Edman 反应）进行 N 端分析。该技术采用每次从蛋白质的 N 端解离和鉴定一个氨基酸残基的方法，是蛋白质序列分析革命化的一项技术。目前，整个测序过程都可通过测序仪自动进行。

Edman 降解测序主要包括式（10.24）中偶联、裂解、萃取和转换 4 个过程。

PITC + 多肽 $\xrightarrow{H_3O^+}$ 多肽PTC

$\xrightarrow{(F_3CCO)_2O}$ 噻唑啉酮衍生物 + 多肽

$\xrightarrow{H^+}$ PTH-氨基酸

(10.24)

首先采用苯异硫氰酸酯(PITC)在 pH 9.0 的温和碱性条件下与蛋白质和多肽 N 端的自由 α-氨基发生偶合反应,形成苯氨基硫甲酰(PTC)衍生物,即 PTC-肽。PTC-肽在无水三氟乙酸等强酸条件下裂解,通过选择性地切断 N 端氨基酸残基肽键,释放出该氨基酸残基的噻唑啉酮苯胺衍生物,由此暴露出相邻的第二个氨基酸残基上的自由 α-氨基,与 PITC 继续发生偶合反应。

用氯丁烷等有机溶剂从反应液中将噻唑啉酮衍生物选择性地萃取出来,去掉了一个 N 端氨基酸残基的肽未被萃取将仍然保留在溶液中。由于噻唑啉酮苯胺衍生物的不稳定性,在萃取出来之后,于 25% 的三氟乙酸水溶液中转化为稳定的苯乙内酰硫脲(PTH)衍生物,即 PTH-氨基酸。

减少了一个氨基酸残基的肽保留在溶液中,再不断重复进行上述反应过程,每一循环都得到一个 PTH-氨基酸。采用色谱或电泳的方法对 PTH-氨基酸与其他

组分进行分离后，对包含在PTH衍生物中的氨基酸即可采用色谱或质谱等分析方法进行鉴定。

Edman降解的最大优点是在水解除去末端标记的氨基酸残基时，不会破坏余下的多肽链。当蛋白质中含有一个或多个半胱氨酸残基时，有时一对半胱氨酸残基会通过二硫键发生交联。在这种情况下进行测序时，首先要对二硫键进行裂解处理(如用过甲酸处理)，然后再进行Edman降解测序。

2）影响Edman降解反应裂解率的因素

如果样品具有足够的纯度，在测序完成后，根据每个循环的产率可得出起始产率(initial yield)，起始产率可以估计蛋白质的真实含量。与氨基酸组成分析得到的含量相比，还可以推测N端是否封闭，而根据每个循环的产率得出的重复产率(repetitive yield)可判断仪器是否正常运行。

目前，对一般蛋白质的分析最多能够分析至N端第50个氨基酸左右，而对蛋白质全序列的分析，首先需要将蛋白质裂解为一系列肽段，对各个肽段进行分析后再拼接。这是因为在经过多次循环后，Edman反应在其偶联、裂解、转换等过程中发生的副反应使PTH-氨基酸的分析谱中将出现较多的杂峰，影响正确辨认。

当蛋白质样品中含有较多的对Edman反应敏感的残基或肽键时，由于这些肽键容易发生断裂，从而得到的裂解率将会更低。

三氟乙酸的作用是构成强酸条件并裂解PTC-肽，但是三氟乙酸也可与Ser和Thr上的羟基发生反应，使Ser和Thr的N端α-氨基发生部分封闭。因此，当反应循环至Ser和Thr时，裂解产率会突然降低。

丝氨酸和苏氨酸的PTH衍生物由于会部分转化为其他产物，也会导致产率降低。

此外，偶联试剂PITC所发生的副反应也会对正确辨认产生影响。

Edman降解法可在全自动测序装置中完成。在全自动测序仪的反应杯中，蛋白质因键合于固相基质上或吸附于惰性玻璃纤维上而被固定，通过泵系统注入反应试剂，同时也通过泵系统控制反应试剂的量。Edman降解反应产生的噻唑啉酮衍生物被输送进入反应杯，再经过水解生成PTH-氨基酸，含有50个氨基酸残基的蛋白质序列可在1h内完成测定，在蛋白质的量低至pmol时也能够得到准确的分析结果。

在Merrifield树脂固相基质上进行的Edman降解反应情况如式(10.25)所

示，通过共价键合将肽片段固定于高分子聚合物薄膜或微米大小的珠粒上，当固相基质浸入液相之后，依次加入所需要的反应试剂，进行 Edman 降解反应并移出反应产物进行分析。

CH_2Cl

Merrified 树脂

$CH_2O—C(=O)—CH(R_n)—NH—\cdots—C(=O)—CH(R_2)—NH—C(=O)—CH(R_1)—NH_2$

Edman降解

R_1 O HN N Ph S

移出产物并进行分析

(10.25)

$CH_2O—C(=O)—CH(R_n)—NH—\cdots—C(=O)—CH(R_2)—NH_2$

连续Edman降解至完成所有氨基酸的分析

在气相序列分析中，常用四级铵盐聚合物聚凝胺（polybrene）作为载体材料。蛋白质或多肽样品通过肽链中极性基团的作用（非共价键合）而固定在化学惰性的玻璃纤维膜上，反应试剂通过氩气流载入并引入到玻璃纤维膜上，通过色谱方法对自动移出的反应产物进行在线检测。由于该方法采用非共价键合固定蛋白质或多肽样品，可在酸性或碱性溶液中防止蛋白质在萃取时发生损失。

2. C 端序列分析

C 端序列分析方法是对 Edman 降解法的一种有益的补充，它适用于 N 端封闭的肽和蛋白质的测序、DNA 序列数据的确认、寡核苷酸探针的设计以及重组蛋白产物的质量控制等方面。

1) C 端分析原理

羧肽酶作为一种肽链外切酶，可用于多肽的 C 端残基的切割，能够应用于蛋白质和多肽的 C 端分析。由于不同类型的羧肽酶对个别氨基酸残基具有不同的

选择性，因而在切割过程中，某些氨基酸残基由于比较稳定或切割速度很慢，从而使羧肽酶的应用不尽完美[28,29]。式(10.26)是用氨肽酶引发的 N 端残基的裂解，式(10.27)是用羧肽酶引发的 C 端残基的裂解。

$$\begin{array}{l} NH_2 \\ | \\ R_1—CH \\ | \\ C{=}O \\ | \\ NH \\ | \\ R_2—CH \\ | \\ C{=}O \\ | \\ NH \\ | \\ R_3—CH \\ | \\ C{=}O \\ \vdots \\ \text{多肽} \end{array} \xrightarrow{\text{氨肽酶}} R_1—\underset{\underset{NH_3^+}{|}}{CH}—\overset{\overset{O}{\|}}{C}—O^- + R_2—\underset{\underset{NH_3^+}{|}}{CH}—\overset{\overset{O}{\|}}{C}—HN—\underset{\underset{R_3}{|}}{CH}—\overset{\overset{O}{\|}}{C}—\cdots \tag{10.26}$$

$$\begin{aligned} &\cdots—HN—\underset{\underset{R_{n-2}}{|}}{CH}—\overset{\overset{O}{\|}}{C}—HN—\underset{\underset{R_{n-1}}{|}}{CH}—\overset{\overset{O}{\|}}{C}—HN—\underset{\underset{R_n}{|}}{CH}—\overset{\overset{O}{\|}}{C}—O^- \\ &\xrightarrow{\text{羧肽酶}} \cdots—HN—\underset{\underset{R_{n-2}}{|}}{CH}—\overset{\overset{O}{\|}}{C}—HN—\underset{\underset{R_{n-1}}{|}}{CH}—\overset{\overset{O}{\|}}{C}—O^- + H_3\overset{+}{N}—\underset{\underset{R_n}{|}}{CH}—\overset{\overset{O}{\|}}{C}—O^- \end{aligned} \tag{10.27}$$

化学法采用化学试剂(例如肼)与蛋白质和多肽的 α-羧基反应进行 C 端分析。在温和的酸性条件下，多肽与无水肼在 90℃反应 20～100h，生成除 C 端残基之外的所有氨基酸残基的氨酰肼衍生物。C 端残基以游离氨基酸形式释放出来，如式(10.28)所示。通过色谱分离反应后的混合物，可对游离氨基酸进行鉴定。

$$\underset{\text{多肽}}{H_2N-CH(R_1)-C(=O)\cdots NH-CH(R_{n-1})-C(=O)-NH-CH(R_n)-C(=O)-O^-} \xrightarrow{H_2N-NH_2} \underset{\text{游离氨基酸}}{R_n-CH(NH_3^+)-C(=O)-O^-} + \underbrace{R_1-CH(NH_3^+)-C(=O)-HN-NH_2 + \cdots + R_{n-1}-CH(NH_3^+)-C(=O)-HN-NH_2}_{\text{氨酰肼}} \tag{10.28}$$

下面介绍一种 C 端自动化测序方法[30]，其整个测序过程只需在开始时对 C 端进行一次性活化，并修饰 Asp 和 Glu 侧链羧基以及 Thr 和 Ser 上的羟基。循环反应实际上分为烷基化和裂解两步，其全过程如图 10.17 所示。

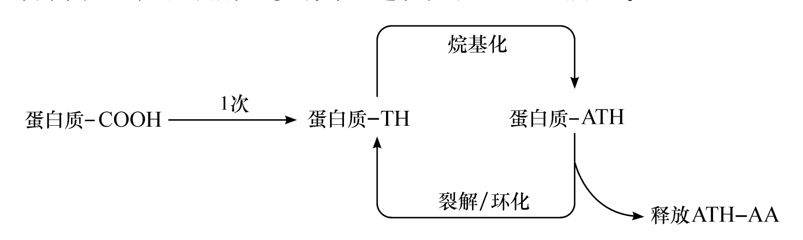


图 10.17　C 端自动化测序全过程示意图

(1) 活化。蛋白质和多肽 C 端的 α-羧基与乙酸酐反应生成可环化的噁唑酮混合酸酐，在硫氰四丁铵的作用下，转化为乙内酰硫脲(thiohydantoin，TH)衍生物，

乙酸酐　　硫氰四丁铵

图 10.18　蛋白质和多肽 C 端的活化

如图 10.18 所示。

（2）酰胺化保护侧链羧基。蛋白质和多肽侧链上的羧基与乙酸酐反应生成难以成环的混合酸酐，与硫氰哌啶作用形成酰胺而保护侧链，如图 10.19 所示。

图 10.19　酰胺化保护侧链羧基

（3）烷基化。C 端环化形成的 TH 衍生物十分稳定，不易被切割。为提高裂解产率，可用溴甲基萘选择性地烷基化修饰硫原子，形成烷基化乙内酰硫脲（Alkylated-TH，ATH）衍生物，如图 10.20 所示。

图 10.20　ATH 衍生物的形成

（4）修饰 Thr 和 Ser 上的羟基。通过修饰蛋白质和多肽中的羟基，可防止羟基对测序的干扰。乙酸酐在活化过程中也会与羟基反应而使其乙酰化，不过该反应不完全。Thr 和 Ser 上的羟基在 N-甲基咪唑（NMI）和乙酸酐的共同作用下基本被乙酰化，如图 10.21 所示。

图 10.21　Thr 和 Ser 上的羟基的修饰

(5) 裂解和衍生。在酸性条件下,C 端的 ATH 衍生物与[NCS]$^{-}$反应裂解生成 ATH-氨基酸,新的 C 端自动形成 TH,不需要重新活化。

2) 影响 C 端测序反应产率的因素

目前,C 端测序可测 1～10 个残基,测序需要的样品量在 1 mmol 以上,与 N 端测序需要的样品量相比较,完成一次测序所需要的样品量要大得多。

由于 C 端测序的副反应多,不同的氨基酸反应产率不同,所以对其图谱的分析也比 N 端测序复杂。马肌红蛋白原是目前 C 端测序结果最好的样品,可测 C 端 10 个以上的残基,通常将其作为标准样品来判断仪器的稳定性。而对富含 Asp、Glu、Thr、Ser 等氨基酸的 C 端,副反应使其产率更低,测序过程将十分困难。

如果 C 端有 Pro,由于吡咯环不能与乙酸酐反应成环,整个测序过程将被终止。

有的氨基酸由于副反应的存在将生成多种 ATH 衍生物,如:Arg 的 ATH 衍生物可能发生乙酰化或烷化;Tyr-ATH 发生乙酰化;Cys 在修饰后形成丙烯酰胺化的 Cys-ATH 以及脱氢 Ala-ATH;脱水 Thr-ATH 会产生两个非对映异构体等,使测序过程难以进行。

3. 重建完整的多肽链一级结构

完成肽片段的测序之后,接下来的工作就是建立肽片段的序列,即建立它们在蛋白质中原有的连接方式。将第一套肽片段的氨基酸序列与第二套肽片段的氨基酸序列进行比较,由于它们的特异性裂解位点不同,通过对它们的氨基酸序列彼此之间互相重叠部分的比较,即可重建完整的多肽链的氨基酸序列。对裂解位点进行鉴定时,要求来自不同裂解反应的肽片段之间应该有足够多的重叠部分。由于每种氨基酸有 20 种可能的位置排列,通常只需要残基之间有少许的重叠部分,就可以进行裂解位点的鉴定了。

图 10.22 是采用胰蛋白酶和 CNBr 进行多肽裂解的示意图,通过比较两套片段中互相重叠部分,便可推断出氨基酸残基中片段的排序。

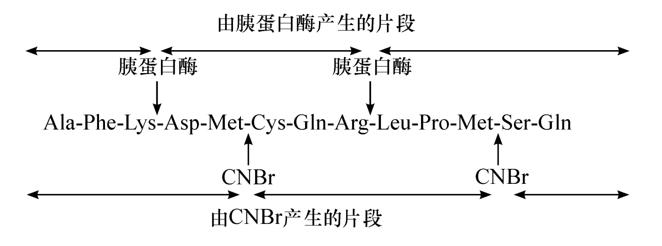


图 10.22 采用胰蛋白酶和 CNBr 进行多肽裂解的示意图

4. 确定完整的蛋白质结构

蛋白质测序的最后工作，就是确定包括不同多肽链之间的二硫键在内的完整的蛋白质结构。推断蛋白质的一级结构，必须确定可能存在的二硫键的位置。按照前面描述的方法对蛋白质进行裂解，得到肽片段的混合物，有些肽片段在混合物中可通过二硫键进行结合。可采用分离条件相同的二维凝胶电泳对肽片段混合物进行分离，在经过第一维凝胶电泳分离后，将基质暴露出来，用过甲酸氧化裂解全部可能存在的二硫键。接着进行第二维凝胶电泳分离由二硫键连接的片段并进行序列测定，再将它们的氨基酸序列与整个蛋白质的序列进行比较，由此确定二硫键的位置。

10.6　蛋白质测定序列前的样品处理

10.6.1　纯度鉴定

进行蛋白质序列测定，要求样品具备足够的纯度（>97%以上）。因此，在测定序列之前，必须对样品进行纯度鉴定。N 端测序样品和 C 端测序样品的纯度鉴定方法基本相同，如反相 HPLC、SDS-PAGE、毛细管电泳、阴离子或阳离子的 FPLC 等鉴定方法，并可采用多种互补有效的手段对样品的纯度进行鉴定。

10.6.2　脱盐

脱盐过程中采用的试剂、仪器必须是测序级的，才能保证脱盐完全，避免引入新的杂质。凝胶过滤、透析、超滤、反相 HPLC 等均可作为脱盐的有效方法。Perkin-Elmer 公司推出的 ProSpin 装置，十分适合对蛋白质含量少的 N 端测序样品进行脱盐处理，它采用 ProBlott PVDF 膜与分子质量 3000Da 截留过滤膜，通过离心方式除去样品中的缓冲盐、去垢剂及其他小分子杂质。而对 C 端测序样品的脱盐，则普遍采用结构和操作方法与 ProSpin 类似的 ProSorb 装置。

10.6.3　巯基修饰方法

N 端测序样品和 C 端测序样品的巯基修饰方法基本相同，主要包括丙烯酰胺修饰和 4-乙烯吡啶修饰两种方法。

1. 丙烯酰胺修饰[31]

1）还原

用 10～15 μl 0.2 mol·L^{-1} Tris，pH 8.4，含有 100 mmol·L^{-1} DTT 的缓冲液溶解蛋白质样品，并加入 SDS 使其最终浓度为 1%，于 70℃水浴中保温 20～30

min 后，再用 4 倍体积重蒸水稀释。

2）烷基化

加入 6 mol · L^{-1}丙烯酰胺浓溶液并控制其最终浓度为 2 mol · L^{-1}，通入氩气或高纯度氮气，于 37℃避光保温 30～60 min。

3）脱盐

加入甲醇至最终浓度为 10%，再用 ProSpin 装置或其他有效脱盐方法进行脱盐。采用 ProSpin 装置进行脱盐的操作步骤为：先用 10 μl 甲醇润湿 ProSpin 上的 ProBlott PVDF 膜，加入反应溶液并离心，至膜上无液体时加入 50 μl 20%甲醇，再次进行离心，切割下膜片并放入 1.5 ml 离心管中，用 0.1%TFA 清洗膜片，再用水漂洗，待其自然晾干后或用氮气吹干，即可进行序列分析。

2. 4-乙烯吡啶修饰[32]

1）还原

于 40 μl 100 mmol · L^{-1} Tris，pH 8.4，含有 6 mol · L^{-1}盐酸胍的缓冲液中溶解蛋白质，加入 1 mol · L^{-1} DTT 浓溶液并使其最终浓度为 20 mmol · L^{-1}，充入氩气，于室温放置 1～2h。

2）烷基化

加入 2 μl 4-乙烯吡啶，充分混合，于室温保温 1～2h。

3）脱盐

按 1∶1 比例加入重蒸水稀释蛋白质溶液，然后用 ProSpin 装置或其他脱盐方法进行脱盐。

10.6.4 N 端封闭基团的去除[33]

对使蛋白质和多肽的 N 端发生封闭的一些基团，可采用下述方法去除。

1. 去除 N-乙酰丝氨酸和 N-乙酰苏氨酸残基

（1）蛋白质吸附在 PVDF 膜上，经过蛋白质 N 端序列分析几个循环后，未能检测出 N 端氨基酸残基。将膜条置于 1.5 ml 的塑料离心管中。

（2）加入 50 μl 三氟乙酸液体后密封管口并在 40℃保温 1 h。

（3）打开管盖，在通风橱中使 TFA 完全挥发。

(4) 将此膜条再放回序列仪中进行分析。

2. 去除N端甲酰甲硫氨酸中的甲酰基

(1) 将吸附了蛋白质的PVDF膜条置于1.5 ml的塑料离心管中。
(2) 加入30 μl 0.6 mol·L^{-1} HCl后密封管口并在25℃保温24 h。
(3) 打开管盖,吸去HCl溶液,再将膜条真空干燥或氮气吹干。
(4) 将此膜条再放回序列仪中进行分析。

3. 去除N端的焦谷氨酸

(1) 将吸附了蛋白质的PVDF膜条置于1.5 ml的塑料离心管中,加入1.2 ml 0.5%(*M*/*V*)PVP-40(溶于100 mmol·L^{-1}无水乙酸中)封闭膜条,使其不再吸附其他蛋白质,于37℃保温30 min,然后用超纯水清洗膜条至少5遍,再用0.5 ml酶解缓冲液漂洗一遍。

(2) 加入100 μl左右焦谷氨酸水解酶(5 μg酶溶于100 μl 50 mmol·L^{-1}、pH 7.0磷酸钠及10 mmol·L^{-1} DTT缓冲液中),于37℃保温5~10 h。

(3) 膜条用超纯水漂洗,自然吹干后放回序列仪中。

4. 去除N-乙酰基封闭的氨基酸残基

(1) 将吸附了蛋白质的PVDF膜条置于1.5 ml的塑料离心管中,用0.5% PVP-40封闭膜条以防止吸附蛋白酶。

(2) 将膜用超纯水充分清洗后,加入5~10 μg胰蛋白酶(溶于100 μl 0.1 mol·L^{-1}碳酸氢铵中,pH 8.0,内含10%乙腈),于37℃酶解24 h。

(3) 将离心管中的溶液移至另一干净的离心管中,用100 μl超纯水清洗膜条,将此清洗液与酶解后的溶液合并,然后将此含有酶解多肽的溶液冷冻干燥。

(4) 加入100 μl50%吡啶及10 μl异硫氰酸苯酯(PITC),通入氮气20 s,然后于60℃保温1 h。此步骤中PITC可以和除N端被乙酰基封闭的多肽以外的酶解后的各个多肽的N端α-氨基反应。

(5) 加入50 μl苯/乙酸乙酯(1∶1体积比)混合溶剂,充分振荡后以3000 *g*离心1 min。

(6) 吸去含有过量试剂及反应副产物的上层溶液,再按照(5)对下层溶液抽提3次,然后真空干燥下层溶液。

(7) 加入100 μl过甲酸(9份甲酸与1份过氧化氢混合后室温放置1 h),于0℃保温1 h,以封闭经过上述几步反应的多肽的N端。

(8) 真空抽干,再用水溶解,然后再将样品抽干。

(9) 将多肽用100 μl 0.2 mmol·L^{-1}、pH7.2磷酸缓冲液(含1 mmol·L^{-1}

DTT)溶解,加入 0.05 单位的 N-乙酰氨基酸去除酶(AARE),于 37℃保温 12 h。

(10) 将反应混合物加样至已预处理过的测序用玻璃纤维支持膜上,放入序列仪中分析。

10.7 蛋白质测序技术平台

10.7.1 N 端蛋白质序列仪

1. 液相旋转杯序列仪

液相旋转杯序列仪的核心是一个反应杯。通过导管将溶解后的蛋白质或多肽样品注入反应杯中,利用旋转离心力将样品均匀涂在反应杯壁上,形成一层薄膜,薄膜的厚度可通过反应杯的旋转速度进行控制。反应试剂及溶剂分别通过导管进入反应杯,与杯内薄膜上的样品的 N 端发生 Edman 反应,通过另一导管引出并收集降解产物 ATZ 氨基酸衍生物。ATZ 氨基酸转化为 PTH 氨基酸后进行鉴定,依次循环分析。该仪器的缺点是样品消耗量较大。

2. 固相序列分析仪

对不易吸附在旋转杯上的小肽和疏水性多肽,可通过蛋白质和多肽的氨基或羧基与载体的活性基团间的共价结合作用,将其固定在惰性载体上,再进行 Edman 降解反应。由于通过共价结合,在有机溶剂洗涤、抽提过程中没有样品的损失,因此循环次数较多。谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸等氨基酸残基除 α-氨基或 α-羧基会与载体结合外,含有的其他氨基或羧基也会与载体发生结合,对含有这类氨基酸残基的蛋白质和多肽,固相序列分析仪不能正确鉴定。

3. 气相序列仪

20 世纪 80 年代初,为了满足分子生物学对蛋白质进行微量分析的需要,针对原有自动化蛋白质序列仪样品消耗量大的缺点,Hewick 和 Hunkpiller 等采用弹筒型玻璃反应室代替旋转反应杯,以四级铵盐聚合物聚凝胺(polybrene)固定样品,以气体方式输送 Edman 降解反应中的部分试剂(如三甲胺)。通过改进后的自动化序列仪灵敏度高,样品消耗量为 50～100 pmol,试剂和溶剂消耗量仅为液相序列仪的十分之一,每步降解循环时间也大大缩短。

20 世纪 80 年代末改进的脉冲液相序列仪,采用载有活性基团的功能性 PVDF 膜共价固定蛋白质和多肽样品,将由气体方式输送的三氟乙烯改为液相脉冲输送。同上一仪器一样,Edman 降解反应生成的 PTH 氨基酸衍生物直接从转化腔中进入 HPLC 系统进行定性、定量分析,可满足不同样品的分析要求。

10.7.2　C 端蛋白质序列仪

C 端序列仪一般由 N 端序列仪改装,基本结构与 N 端序列仪类似。与 N 端序列仪不同的是,C 端序列仪的所有化学反应均在弹筒型反应室进行,ATH-AA 切割下来后,在转化腔中干燥和溶解后即进入 HPLC 系统进行分离分析。由于采用不同的试剂,C 端序列仪和 N 端序列仪互不兼容,否则容易发生管道堵塞。

参 考 文 献

[1] Shen Z J, Sun Z M, Wu L et al. *J. Chromatogr. A*. 2002, **979**: 227

[2] Li H, Wang H, Chen J H et al. *J. Chromatogr. B*. 2003, **788**: 93

[3] 吴强恩, 郑力行, 谢芳等. 复旦大学学报(医学版). 2005, **32**: 355

[4] Waters 液相色谱技术在临床生理研究中的应用. 18

[5] Waters Quality Parts, Chromatography Columns and Supplies Catalog. 2005-2006

[6] Welch L E, Lacourse W R, Mead D A et al. *Anal. Chem*. 1989, **61**: 555

[7] 于泓, 丁永胜, 牟世芬. 色谱. 2002, **20**: 399

[8] 王宗义, 张丽英, 李德发等. 分析化学. 2003, **31**: 1187

[9] 韩连书, 高晓岚, 叶军等. 检验医学. 2005, **20**: 220

[10] Schmid N M, Tuscher C. *Phamr. Biomed. Anal*. 2002, **27**: 599

[11] Petersson C, *J. Liq. Chromatogr*. 1986, **9**: 269

[12] Dobashi A. *J. Liq. Chromatogr*. 1986, **9**: 243

[13] Morikawa A, Hamase K, Inoue T et al. *J. Chromatogr. B*. 2001, **757**: 119

[14] 赵华, 李晶, 袁佩等. 分析化学. 2006, **34**:1433

[15] Morikawa A, Hamase K, Zaitsu K. *Anal. Chem*. 2003, **312**: 66

[16] Zhao H, Hamase K, Morikawa A et al. *J. Chromatogr. B*. 2004, **810**: 245

[17] 赵书林,林向成,沈江珊等. 分析测试学报. 2003, **22**: 8

[18] Dzygiel P, Wieczorek P, Jonsson J A. *J. Chromatogr. A*. 1998, **793**: 414

[19] Terabe S. *Trends. Anal. Chem*. 1989, **8**: 129

[20] Tanaka Y, Terabe S. *J. Chromatogr. A*. 1997, **781**: 151

[21] 阮宗琴,李菊白,陆豪杰等. 色谱. 2000, **18**: 148

[22] Wan H, Blomberg L G. *J. Chromatogr. A*. 2000, **875**: 45

[23] Terabe M, Shibata Y, Miyashita. *J. Chromatogr*. 1989, **480**: 403

[24] Otsuka K, Terabe S. *J. Chromatogr. A*. 1990, **515**: 221

[25] Swartz M E, Mazzeo J R, Grover E R. *Anal. Biochem*. 1995, **231**: 65

[26] Desbene P L, Fulchic C E. *J. Chromatogr. A*. 1996, **749**: 2 579

[27] 付煜荣, 颜流水, 罗国安等. 分析化学. 2004, **32**: 1575

[28] Hayashi R, Moore S, Stein W H. *J. Biol. Chem*. 1973, **248**(7): 2296

[29] Ambler R P. *Methodes Enzymol*. 1972, 143

[30] Boyd V L, Bozzini M, Zon G et al. *Anal. Biochem*. 1992, **206**(2): 344

[31] Brune D C. *Anal. Biochem.* 1992, **207**: 285

[32] Fullmer C S. *Anal. Biochem.* 1984, **142**: 336

[33] LeGendre N et al. Purification of proteins and peptides by SDS-PAGE. In: Matsudaira P. A pratical guide to protein and peptide purification for microsequencing. 2nd ed. USA: Academic Press, 1993

第 11 章　蛋白质组分析

蛋白质组(proteome)的概念是 1994 年由澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams 首先提出的。蛋白质组源于蛋白质(protein)与基因组(genome)两个词的杂合,其定义为 proteins expressed by a genome,即一个基因组表达的全部蛋白质。随后,学者们对蛋白质组学的含义做了进一步的阐述,认为“proteome”代表一个完整生物或生物体不同细胞组合中的全部蛋白质。因此,目前认为蛋白质组的内涵是一个细胞、一类组织或一种生物的基因组所表达的全部蛋白质[1]。

蛋白质组学(proteomics)是研究蛋白质组的一门新兴学科,旨在阐明生物体全部蛋白质的表达模式及功能模式。蛋白质组学的内涵和传统生化中的蛋白质化学是不同的。蛋白质化学着重于单一蛋白质结构、功能的研究,例如某一种蛋白质或蛋白质亚基的全序列分析、三维立体结构的确定、这样的结构如何执行功能及在生理上所扮演的角色,以及代谢的生化机制等。蛋白质组学则是研究多种蛋白质组成的复杂系统。Proteomics 的字尾“-omics”的意思是“组学”,代表对生物、生命体系研究工作方式的重新定义,也就是说,蛋白质组学是对基因组所表达的整套蛋白质的分析,其研究对象是多蛋白质混合物的“系统”行为,而不是“单一组成”的行为。它通过对一个大系统(如生理或病理状态下的特定的通路、细胞器、细胞、组织、器官或机体)中包含的所有蛋白质进行分离、鉴定、表征和定量,提供关于该系统准确和全面的数据和信息。

蛋白质组学涵盖的学科面相当广泛,研究的领域很多,本章着重介绍在当前的蛋白质组学研究中所涉及的分离分析技术。

11.1　蛋白质组与基因组

每一个人类细胞中含有制造一个完整的人所需的全部信息,然而,并不是全部基因在所有细胞中都表达。通常,一个细胞中表达两类基因:①必须功能蛋白质的基因;②行使细胞专一性功能蛋白质的基因。因此,一种生物有一个基因组,但有许多蛋白质组[2]。蛋白质组与基因组在内涵上有很大的不同,主要表现在以下 4 个方面:

1) 蛋白质组具有多样性

在转录时,一个基因可能以多种 mRNA 形式剪接,并且,同一种蛋白质可能以多种形式进行翻译后的修饰。

如图 11.1 所示，一段含有 4 个外显子的基因在转录的过程中，可能剪接为一种以上形式的 mRNA，从而翻译成一种以上的蛋白质，且翻译后的蛋白质还可能有多种的修饰形式(posttranslational modification，PTM)。根据已有的研究结果，人们估计人类基因组三万多个基因可能形成多于 100 000 种的 mRNA 剪接形式。

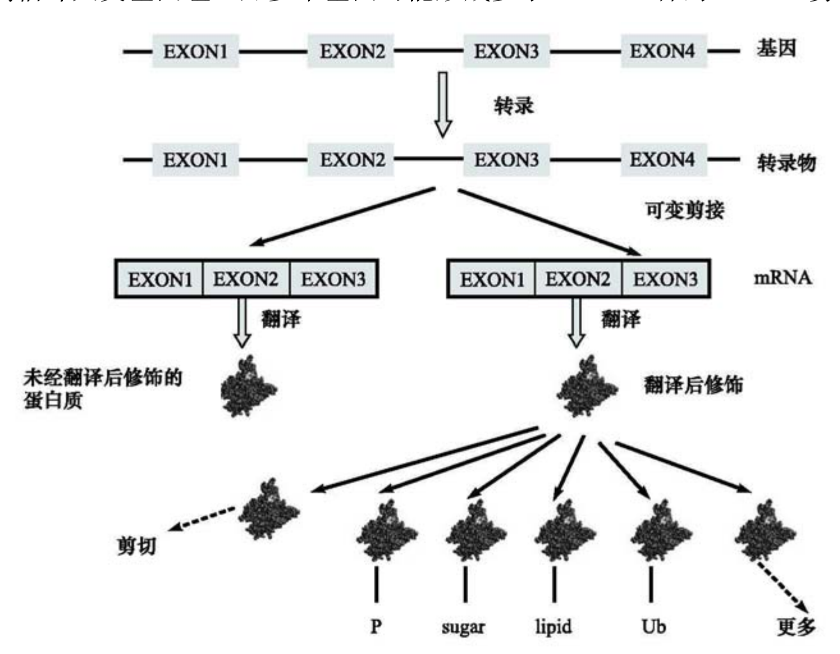


图 11.1 基因以多种 mRNA 形式剪接的示意图

EXON：外显子，真核细胞基因 DNA 中的编码序列。这样的序列可转录为 RNA 并进而翻译为蛋白质。P 代表磷酸化，sugar 代表糖基化，lipid 代表脂肪酰化，Ub 代表泛素化[3]

此外，细胞内的大部分蛋白质通常都经历过翻译后修饰。迄今为止，已发现的蛋白质翻译后修饰方式超过 200 种，主要是磷酸化、糖基化、酰基化、硝基化、磺基化、脂化、泛素化和水解修饰等。如果把一种修饰蛋白视为一种新的蛋白质，那么蛋白质组的蛋白质数量将远远大于相应的基因组的基因数量。在这个意义上，估计人类蛋白质组的蛋白质种类大约在 20 万到 200 万之间。而且，由于很难确定度量修饰蛋白质种类的尺度，人们也许永远不能像确定基因组核苷酸序列那样，准确地统计出生物体内蛋白质组的蛋白质总数。因此，一个蛋白质组不是一个基因组的直接产物。可以说，对基因组核苷酸序列的测定是一种“有限”的工作，而对蛋白质组蛋白质种类的确定则是一种“无限”的工作。

2) 在蛋白质组的研究中，时间和空间的影响都不可忽视

在个体发育的不同阶段或细胞的不同活动时期，细胞内产生的蛋白质种类是

不一样的。不同蛋白质的寿命也不一样。有些蛋白质在合成后成为细胞的结构成分，相当稳定；而有些蛋白质在产生后被用来进行某种细胞活动，比如基因转录的调控，工作一旦完成即被迅速降解。因此，在分析蛋白质组的蛋白质成分时，需要把时间作为一个重要的参数。

蛋白质通常分布在细胞的不同部位，它们的功能与其空间定位密切相关。而且，细胞中的许多蛋白质并非静止不动的，它们常常通过在不同亚细胞环境间的运动发挥作用，像细胞周期的调控过程、细胞的信号转导和转录调控，都要依赖于蛋白质空间位置的变化。例如，我们的研究工作曾发现，抗癌药物 10-羟基喜树碱(hydroxycamptothecin，HCPT)通过线粒体途径诱导细胞凋亡时，可引起线粒体膜间隙中的一种水溶性蛋白质凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor，AIF)从线粒体释放到胞质，然后迅速转位到细胞核内而引起核 DNA 的损伤[4]。

3) 蛋白质间主要以相互作用的形式参与生命活动[5]

一种蛋白质功能的实现，离不开它与其他蛋白质之间的相互作用。生物体中大多数蛋白质都不是孤立存在的，而是在相互联系、相互制约的过程中形成复杂的蛋白质复合体而发挥其功能的。蛋白质-蛋白质相互作用控制着生命的各个过程，是整个生命结构和生命活动的基础和重要特征之一。因此，要了解细胞的功能，必须从孤立情况下和与别的蛋白质相互作用情况下这两个层面来认识蛋白质的功能。

4) 蛋白质组研究对技术的依赖性和要求远远超过基因组学

在基因组学研究中，大规模测序技术的建立和成熟促使人类基因组计划得以提前完成。但是，在技术上，它只需满足一条基本要求，即准确率达到 99.99 %，甚至于没有定量的要求。而且，在基因组研究中普遍使用的 PCR 技术使核酸的扩增变得十分容易和规模化。蛋白质组研究的要求则要高得多。为了解决蛋白质组学研究中的分离和检测问题，到目前为止，虽然人们已经从化学、生物化学、分子生物学、免疫学、分子遗传学、结构生物学等多个层面，提出了许多技术策略，但遗憾的是，还没有建立起像“人类基因组测序”那样的对生命科学具有决定性意义的技术平台。而且，迄今为止，还没有类似于使核酸扩增的 PCR 技术那样的可以使蛋白质扩增的技术。因此，蛋白质组学是由技术启动，但又受技术制约的探索性科学。

11.2　蛋白质组学研究对生物分析化学提出的挑战

表 11.1 列出了目前蛋白质组学分析中使用的分离与鉴定技术，这些技术都是基于分析化学或生物分析化学的原理而建立的。它们在当前蛋白质组学的分析工

作中发挥了重要的作用，但是在可测定的蛋白质分子质量范围、动态范围、可分离的蛋白点数、适用范围等方面还不能完全达到蛋白质组学研究的要求。

表 11.1 目前蛋白质组学分析中使用的分离与鉴定技术[6~12]

技术	是否需要标记	是否可用于PTM检测	可测定的蛋白质分子质量范围	动态范围	可分离的蛋白点数	方法的适用范围
传统的双向电泳方法(2-DE)	否	是	10～200 kDa	1 000	3 000	定量困难，方法的重复性差
DIGE	花青荧光染料(Cy2、Cy3、Cy5)标记伯氨基	是	10～200 kDa	10 000[6]	3 000[7]	适用于检测高表达水平、长半衰期的蛋白质
基于反相色谱的二维色谱系统[8]	否	是	＞5 kDa的肽或蛋白质	100	2 500	限于UV检测，未与MS联用
MudPit	可以用 N^{14}/N^{15} 标记氨基酸	是	蛋白质经酶解后的多肽混合物	10 000[9]	872[10]	适用于较复杂的蛋白质混合物，进行MS分析前需进行分级分离
MALDI-TOF-MS	否	是	＞10 kDa，实际测定蛋白质经酶解后的多肽混合物	25	不适用	通过肽质量指纹图鉴定已分离的蛋白质
SELDI-TOF-MS[11]	否	是	＜40 kDa	25	不适用	利用蛋白质芯片对生物样品中蛋白质的质量进行分析
ICAT分析技术	以ICAT试剂标记巯基	是	蛋白质经酶解后的多肽混合物	无数据	496[12]	适用于含巯基蛋白质的相对定量分析
cICAT分析技术	以可裂解的 C^{12}/C^{13} ICAT试剂标记巯基	否	蛋白质经酶解后的多肽混合物	10 000	496	适用于含巯基蛋白质的相对定量分析

注：2-DE，双向电泳(two dimensional electrophoresis)；DIGE，荧光双向差示凝胶电泳(fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis)；MudPit，用于蛋白质分离的多维色谱(multi-dimensional for protein identification)；SELDI-MS，表面增强激光解吸离子化-质谱(surface enhanced laser desorption ionization-MS)；MALDI-MS，基质辅助激光解吸离子化-质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-MS)；ICAT，同位素标记的亲和标签(isotope-coded affinity tag)技术；cICAT，可裂解的ICAT(cleavable ICAT)技术；PTM，蛋白质翻译后修饰(posttranslational modification)。

图 11.2 展示出现行的生物分析化学/临床检验方法所能达到的灵敏度和分辨率，以及要实现蛋白质组学研究目标应该达到的灵敏度和分辨率。

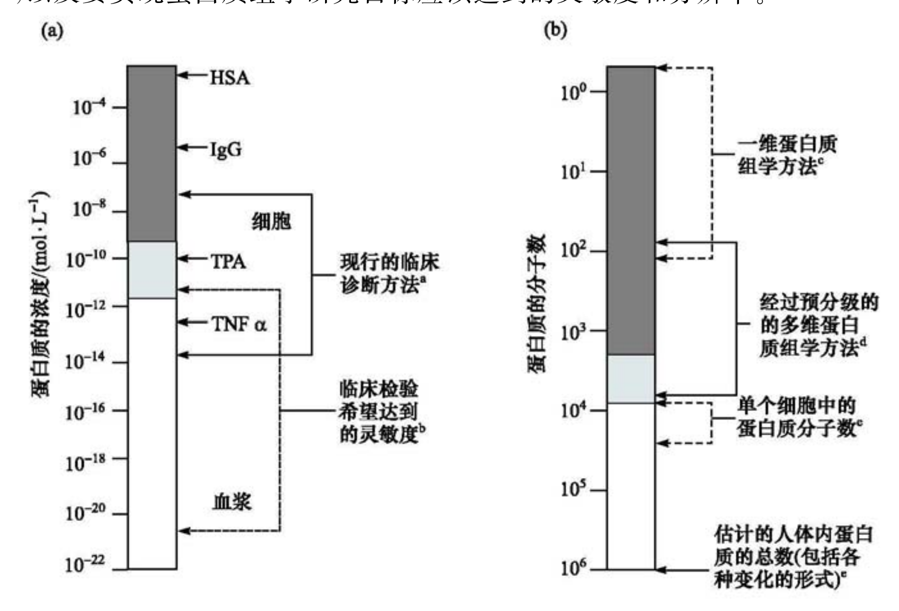


图 11.2　蛋白质组学分析方法的灵敏度和分辨率[13]

(a) 蛋白质组学方法的灵敏度。深灰色框和浅灰色框表示目前各种分析方法(包括生物化学分析方法)所能达到的检测灵敏度，其中，深灰色框表示样品未经预分级或去除高丰度蛋白处理时的检测灵敏度，浅灰色框表示样品经过预分级或去除高丰度蛋白处理后的检测灵敏度；白色框表示检测生物样品还需要达到的检测灵敏度；(b) 蛋白质组学方法的分辨率。深灰色框和浅灰色框表示目前各种分析方法(包括生物化学分析方法)所能达到的分辨率，其中，深灰色框表示样品未经预分级或去除高丰度蛋白处理时的分辨率，浅灰色框表示样品经过预分级或去除高丰度蛋白处理后的分辨率；白色框表示检测生物样品还需要达到的分辨率。**a**.经美国 FDA 核准的血浆诊断方法所能达到的浓度范围。**b**.要检测一个哺乳细胞体积内($\approx 1\times 10^{-12}$L)只有一个拷贝或 1ml 血浆含有一个拷贝的蛋白质时，临床检验应达到的灵敏度。**c**.未经样品预处理的一维蛋白质组分析(蛋白质经酶解后再作 MS 分析)所具有的分辨率。**d**.多维蛋白质组分析(蛋白质经 His-或 Cys-标记/富集/RPHPLC-强阳离子交换色谱分离/MS/MS)所具有的分辨率。**e**.包括基因以多种 mRNA 形式剪接、基因突变以及翻译后修饰所产生的蛋白质在内的分子数。HAS：人血清蛋白；IgG：免疫球蛋白 G；TPA：组织纤溶酶原激活物；TNFα：肿瘤坏死因子 α

表 11.1 和图 11.2 表明，蛋白质组学研究对生物分析化学提出了很高的要求：

(1) 对含有巨大数量的多蛋白质成分的复杂体系进行全分离是蛋白质组学研究迫切需要解决的问题。根据基因组学的研究结果预测，一个细胞中正常表达的蛋白质数量为 5000～10 000 种甚至更多，分子质量多在 50～100 kDa 的范围，其等电点、疏水性、修饰状况等差别很大。目前，最好的分离方法也只能分离 1500 种左右的蛋白质，因此，还需要建立分辨率更高的分离技术平台。

(2) 所建立的生物分析化学分离分析方法应具有很宽的动态范围才能适应细

胞内蛋白质组分析的要求。已有的研究结果表明,细胞内高表达蛋白的拷贝数为 $10^5 \sim 10^6$,中等程度表达蛋白的拷贝数为 $10^3 \sim 10^4$,低表达蛋白的拷贝数为 $10^1 \sim 10^2$,动力学范围为 10^6。而在血浆中,动力学范围则高达 10^{12}。例如在酵母细胞里,有些细胞周期调控蛋白不到 100 个分子,而糖基酶则可能有 200 万个分子。蛋白质组学的研究要求能同时分析各种各样的蛋白质,也就是说,要尽可能得到蛋白质组的"全息信息"。另一方面,低表达蛋白往往是具有重要生物学功能的蛋白质,因此,又需要排除巨量的高表达蛋白质的干扰,把微量的蛋白质从蛋白质混合物中鉴定出来。目前,还没有一种生物分析化学技术能够完全满足这样的分析要求。

(3) 蛋白质组学研究对检测灵敏度也提出了很高的要求。由图 11.2 可以看出,现行的生物分析化学方法的检测灵敏度只在 10^{-14} mol · L^{-1} 左右,而生物样品,以血浆为例,对其中大部分蛋白质成分的检出则要求方法学的灵敏度要再高出 3～8 个数量级。对拷贝数为 $10^1 \sim 10^2$ 的低表达蛋白的分析,要求方法学的检测灵敏度达到 10^{-22} mol · L^{-1} 甚至更高。

(4) 原位、实时检测。由于生命活动过程中蛋白质的表达和功能的发挥有着明显的时空依从性,因此,对于蛋白质组的原位、实时检测显得十分重要,这是生物分析化学今后的重要发展方向。

(5) 对蛋白质相互作用的检测是蛋白质组学研究中一个非常重要的内容,迄今为止,人们已采用了生物化学方法[如亲和色谱、亲和印迹、免疫共沉淀、化学交联法、荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer,FRET)法、生物分子相互作用分析系统(biomdecular interaction analysis, BIACORE)]、分子生物学方法(如酵母双杂交和反相双杂交体系、三杂交体系、噬菌体展示技术)、基于质谱的方法[如串联亲和纯化(tandem affinity purification,TAP)、高通量质谱蛋白质鉴定(high-throughput mass spectrometric protein complex identifieation, HMS-PCI)]以及遗传学等多种技术方法研究蛋白质相互作用。但是由于方法本身的限制性和分析条件的特异性,往往会造成假阳性或假阴性的结果。Mering 等[14]曾比较了酵母双杂交、质谱等 5 种方法研究酵母细胞中蛋白质相互作用的结果,在 80 000 对相互作用中,只有 2400 对相互作用被两种或两种以上的技术所支持。因此,发展基于生物化学的新的、重现性好的蛋白质相互作用研究策略也是十分重要的。

所以,仅仅通过一两种技术,显然不可能完成对蛋白质组内成千上万种不同性质的蛋白质的分离和检测。"*Nature*"在 2003 年曾发表综述指出[15]:没有任何一种技术能满足从表达到功能的所有类型的蛋白质组学研究的需要,尤其是在与疾病有关的情况下。因此,新的生物分析化学方法学的研究与实践在其中有重要的地位。

11.3　蛋白质组学的分析策略与研究路线

蛋白质组学分析不是单一的方法学，而是各种分离分析技术、鉴定技术、生物信息学手段的有机整合，因此，它是一种分析策略。

11.3.1　蛋白质组学的基本分析策略

目前在蛋白质组学研究中有两类分析策略[16]：Bottom Up（“由下至上”）策略和 Top Down（“由上至下”）策略。Bottom Up 策略又分为电泳策略和鸟枪法（shotgun）策略（图 11.3）。

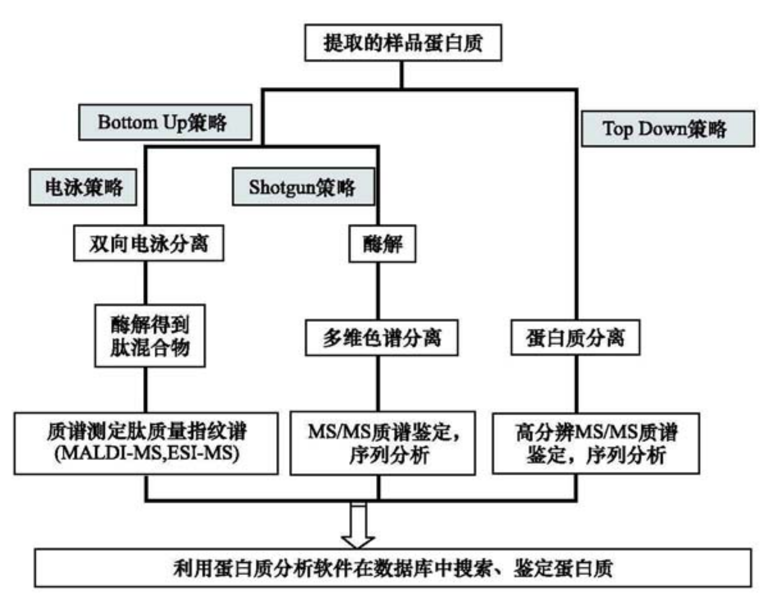


图 11.3　蛋白质组学分析的基本分析策略

电泳策略是目前常用的一种分析策略。来自组织、体液或培养细胞的经过破碎、裂解、溶解等处理后的样品经双向电泳分离成单一蛋白质，以酶切位点专一的蛋白酶水解成为肽的混合物，再以 MALDI-TOF-MS 测得蛋白质酶解肽段的精确质量数，在蛋白质数据库中检索，寻找具有相似肽质量谱的蛋白质。

鸟枪法策略（shotgun analysis）[17]如图 11.4 所示。与电泳策略不同，在鸟枪法分析策略中，样品中的蛋白质混合物并不经过双向电泳的分离而直接进行酶解，产生总数可能超过 1000 种的肽的复杂混合物。然后，以多维色谱（如 SCX 离子交换色谱、反相色谱的二维分离）结合 MS/MS，或以液相色谱分离/离子迁移谱（ion mobility spectrometry，IMS）结合 MS/MS 进行分离、分析，所得到的质谱数据通

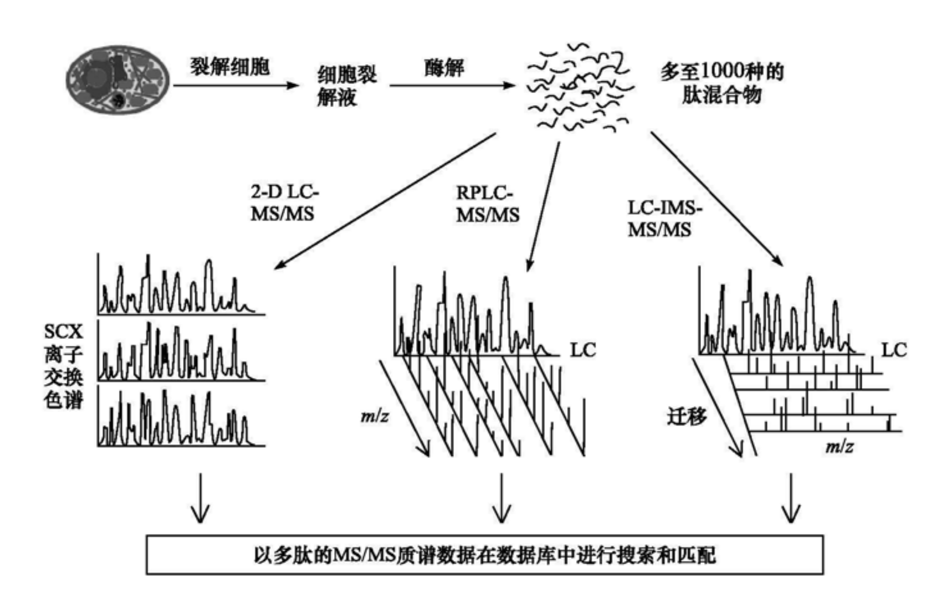


图 11.4　鸟枪法的基本分析策略

过数据库搜索确定肽序列,进而鉴定蛋白质。

Top Down 策略中,并不经过酶解而直接获取蛋白质的质谱信息。这种分析策略要求使用分辨率很高的质谱技术,如傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry,FTMS)。目前尚未得到广泛使用。

11.3.2　蛋白质组学的研究路线

目前,蛋白质组学研究有两条路线。一条路线类似于基因组学的研究,即力图查清人类 3 万~4 万个基因编码的所有蛋白质,建立蛋白质数据库,从而获得有关生命活动的"全景式"信息。这一研究路线的前景是诱人的,但是在短期内尚不能完全实现。另一条是基于比较的研究路线,称为比较蛋白质组学(comparative proteomics),国外的文献中也有称为差异显示蛋白质组学(differential display proteomics)或表达蛋白质组学(expression proteomics)。其中一种典型的基于电泳策略的研究路线如图 11.5 所示。在比较蛋白质组学的研究中,将同一来源但处于不同状态(如生理/病理状态、药物干预前/药物干预后等)的样品分别进行分析,对所获取的信息进行比较,筛选出差异表达蛋白质点,再进行酶解和质谱分析,通过数据库搜索来鉴定蛋白质。这一分析策略并不需要去描述整个细胞或组织的全部蛋白质组,但是却非常关注在不同状态下蛋白质组的表达差异,特别适合于病理过程和药物干预过程的研究,因此,在生命科学的各个领域得到了广泛的应用。

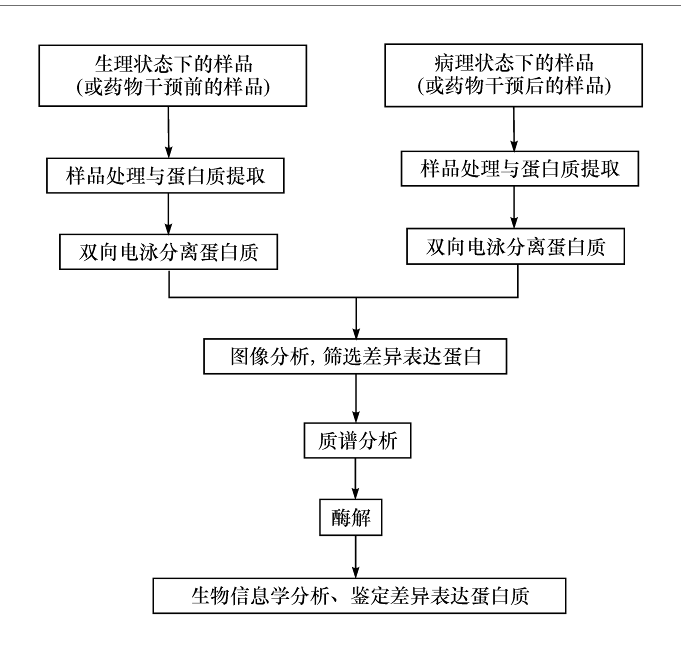


图 11.5　比较蛋白质组学分析的研究路线

11.4　双向电泳技术及其改进

双向电泳(two dimensional electrophresis,2-DE)是当前蛋白质组学研究中分辨率最高、信息量最大的分离技术。在比较蛋白质组学研究中,双向电泳是不可缺少的手段。目前所应用的二维电泳体系是由 O'Farrell 等于 1957 年发明的,其原理是根据蛋白质的两个一级属性(等电点和相对分子质量),将一种蛋白质样品进行两次电泳,即:在第一个方向上按等电点高低进行分离,称为等电聚焦;在第二个方向(与第一次电泳成直角的方向)上按相对分子质量大小进行分离。蛋白质组学研究中用得最多的是由固相 pH 梯度等电聚焦(immobilized pH gradients isoelectric focusing,IEF)/SDS-PAGE 所构成的双向电泳体系[18]。

11.4.1　双向电泳的流程

双向电泳的流程如图 11.6 所示:(a)为等电聚焦的过程,被分离的样品加在水化的固相 pH 梯度胶条(immobilized pH gradient trip)上,通电后,样品中的蛋白质成分按照各自的等电点聚集在胶条上不同的 pH 梯度区,形成了不同的谱带,每个谱带中聚集了等电点相近的蛋白质成分;(b)为 SDS-PAGE 电泳的过程,第一向等电聚焦后的胶条在 SDS 和 DTT 中平衡后,贴在 SDS-PAGE 胶板的负极端进行电泳。电泳结果通过染色显示。

1. 蛋白质样品的制备

有效的可重复的样品制备方法是双向凝胶电泳成功的关键，也是最困难的步骤。样品可以是细胞、组织、分泌蛋白质、体液蛋白质等。目前没有一种样品制备方法能够广泛地适用于各种各样的样品，所以，对于每一个有着不同要求的样品，都需通过具体的实验来摸索最合适的实验条件。

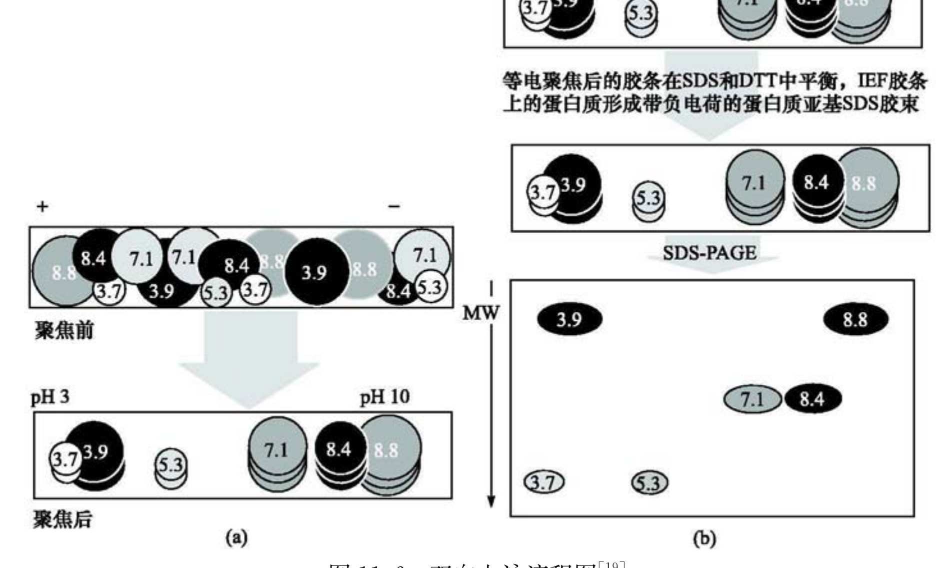


图 11.6　双向电泳流程图[19]

（a）第一向等电聚集电泳。通电后，样品中的蛋白质成分按照各自的等电点聚集在胶条上不同的 pH 梯度区；（b）第二向 SDS-PAGE。样品中的蛋白质成分按照蛋白质亚基分子质量的大小加以分离

1）蛋白质样品制备的一般要求

一般来说，一种理想的、有效的样品制备方法应满足以下要求：①应使所有待分析的蛋白质样品全部处于溶解状态（包括多数疏水性蛋白），且制备方法应具有可重现性；②溶解方法要保证样品在电泳过程中保持溶解状态，避免溶解性低的蛋白质（如膜蛋白）在等电聚焦时由于溶解度降低而沉淀析出；③防止在样品处理过程中发生蛋白质的化学修饰，包括蛋白质降解、蛋白酶或尿素热分解后引起的修饰；④排除核酸、多糖、脂类和其他干扰分子，同时，还应避免处理环境对蛋白质的污染；⑤尽量去除起干扰作用的高丰度或无关蛋白，从而保证待研究蛋白在可检测水平；⑥尽可能缩短处理样品的时间，尽可能在低温环境中处理样品。

为了提高分析复杂蛋白质混合物的分辨率，首先必须使样品的蛋白质得到充

分的溶解。对于可溶蛋白的样品，如血清、体液等，只需简单处理便可直接用于双向电泳。对细胞，特别是组织，则需经过破碎、裂解、溶解等处理后才能上样。

2）细胞或组织样品的破碎

样品破碎的方法以最小限度地减小蛋白质水解和其他形式的降解为原则，因此，破碎应在低温、含有裂解液的环境中进行。

组织样品往往来源于临床取材，成分混杂、状态不一，处理不当会对蛋白质组分析的结果产生干扰。因此，在取材时应尽可能地去除间质成分，对标本进行清洗以除去血液，并尽量刮取组织表面的细胞。如果条件允许，可采用荧光标记的流式细胞仪（flow cytometry，FCM）或激光捕获显微切割术（laser capture microdisection，LCM）来获取纯净的细胞样品。组织样品的细胞也应在含有裂解液的环境中进行破碎。具体的方法见第 2 章。

3）裂解

细胞裂解液含有变性剂、表面活性剂、还原剂、起载体作用的两性电解质以及蛋白酶抑制剂，其组成见表 11.2。

表 11.2　裂解液的组成

试剂	终浓度	用量
尿素	8 mol · L^{-1}	9.6g
CHAPS	4%	0.8g
二硫苏糖醇（DTT）	—	400 mg
载体两性电解质 pH 3～10	2%	400 μl
蛋白酶抑制剂	—	28 μg
双蒸水	—	至 20 ml

（1）变性剂。变性剂用于改变溶液离子强度和 pH，破坏蛋白质-蛋白质相互作用。它通过改变溶液中的氢键，破坏蛋白质的二级和三级结构，使蛋白质充分伸展，并将其疏水中心完全暴露，降低接近疏水性氨基酸残基的能量域。最常用的变性剂是尿素，常用浓度为 8 mol · L^{-1}，根据蛋白质样品溶解的需要可增至 9～9.8 mol · L^{-1}。硫脲和尿素联合使用可以大大增加蛋白质，特别是膜蛋白的溶解性，一般用 2 mol · L^{-1} 硫脲和 5～8 mol · L^{-1} 尿素。高浓度尿素的使用是为了增加硫脲在水中的溶解性。

（2）表面活性剂。经过变性剂处理而暴露蛋白质的疏水基团后，还常需至少一种表面活性剂来溶解疏水基团。常用的表面活性剂有离子型表面活性剂 SDS、非离子型表面活性剂 Triton X-100 和 NP-40、两性离子表面活性剂 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸（CHAPS）等，通常的使用浓度为 0.5%～4%。为了提高膜

蛋白的溶解性，并帮助膜蛋白质与脂类的分离，还可使用一些新的表面活性剂，如 3-[(3-胆烷酰胺丙基)-二甲铵]-2-羟-1-丙磺酸盐{3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxyl-1-propanesulfonate，CHAPSO}、庚-乙二醇苯辛基醚(heptaethylene glycol octylphenyl ether，X-114)、聚氧乙烯甜菜碱油酸酯(polyoxyethylene sorbitan monooleate，Tween-80)、(4-己基)苄基-二甲氨基丙烷磺酸盐[(4-hexyl)benzyl dimethyl ammonio propane sulfonatesulfobetaine，C6Bz]、十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide，CTAB)、磺基甜菜碱类表面活性剂(sulfobetaine surfactant，SB 3-10、SB 3-12)等。

(3) 还原剂。用于还原二硫键和防止蛋白质氧化。在变性剂和表面活性剂联用条件下，还原剂可使已变性的蛋白质展开更完全、溶解更彻底。常用含自由巯基的还原剂二硫苏糖醇(DTT)、乙二硫醇(dithioerythreitol，DTE)、β-巯基乙醇以及非离子型还原剂三丁基膦(tributylphosphine，TBP)。

(4) 载体两性电解质。载体两性电解质(carrier ampholyte)的作用在于屏蔽蛋白质分子表面的疏水基团，增加蛋白质分子的溶解度。为了保证实验的精确性，在选择不同 pH 范围的 IPG 胶条时，应使载体两性电解质的 pH 与之相符合。

(5) 蛋白酶抑制剂。细胞破碎后，蛋白质水解酶被释放或被激活，这可能使双向电泳的结果复杂化。因此，在裂解液中还需加入抑制蛋白质水解的蛋白酶抑制剂。一种蛋白酶抑制剂只对某一类蛋白酶起作用，因此可考虑使用复合的蛋白酶抑制剂。表 11.3 列出了常用的蛋白酶抑制剂及被抑制的酶。

表 11.3　蛋白酶抑制剂

蛋白酶抑制剂	使用浓度	所抑制的酶	应注意之点
苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF)	1 mmol • L^{-1}	不可逆抑制丝氨酸水解酶和一些半胱氨酸水解酶	在水溶液中很快失活，须现配现用；在含有巯基的试剂(如 DTT)中效果不好，因此，需先加 PMSF，后加含有巯基的试剂；毒性大
氨乙基苄基磺酰氟(aminoethyl benzyl sulfonyl fluoride，AEBSF)	4 mmol • L^{-1}	与PMSF 相近，但更易溶于水且毒性低	AEBSF 具有修饰能力，会改变蛋白的 pI
EDTA，EGTA	1 mmol • L^{-1}	金属蛋白酶	
多肽蛋白酶抑制剂(如亮肽素、抑肽素、抑肽酶、苯丁)	2～20μg • ml^{-1}	不可逆抑制剂。亮肽素(leupeptin)抑制多种丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶；抑肽素(pepstatin)抑制天冬氨酸蛋白酶；抑肽酶(aprotinin)抑制多种丝氨酸蛋白酶；苯丁(bestatin)抑制氨基酸多肽酶	这类抑制剂是小分子多肽，因此有可能在双向电泳的结果中出现；在有 DTT 存在下起作用；抑肽素在 pH 9 时不能起抑制作用

续表

蛋白酶抑制剂	使用浓度	所抑制的酶	应注意之点
甲苯磺酰基赖氨酸氯甲基酮(tosyl lysine chloromethyl ketone，TLCK)，甲苯磺酰基苯丙氨酸氯甲基酮(tosyl phenylalanine chloromethyl ketone，TPCK)	0.1～0.5 $mmol \cdot L^{-1}$	不可逆抑制丝氨酸和半胱氨酸的蛋白酶	
苄脒(benzamidine)	1～3 $mmol \cdot L^{-1}$		

用于组织标本的裂解液与细胞样品的裂解液组成大致相同，但由于组织标本的复杂性，组织标本裂解液中可同时使用多种表面活性剂、蛋白酶抑制剂。

2. 固相 pH 梯度胶条的重泡胀与加样

重泡胀(IPG strip rehydration)的实质是让样品能完全以可溶性的形式进入 IPG 内，从而进行接下来的 IEF。常用的重泡胀液成分为 8 $mol \cdot L^{-1}$ 尿素的溶液(或 2 $mol \cdot L^{-1}$ 硫脲和 7 $mol \cdot L^{-1}$ 尿素)，其他成分为 2%非离子(NP-40、Triton X-100)或两性离子表面活性剂(如 CHAPS)。由于尿素的浓度很高，样品重泡胀过程中水的挥发可能导致尿素结晶，因此要在加样后的胶条上覆盖一层惰性矿物油。

加样量根据显色方法和需求而定。如果是想用 18 cm 的 IPG 胶、银染色观察一个蛋白质的表达全谱，加样量在 100～150μg 为宜；而如果是要进行考马斯亮蓝染色或质谱分析、转膜分析，此时的制备胶上样量可以从 500μg 到几毫克。加样方案有两种：①IPG 胶重泡胀后，利用加样杯，边运行等电聚焦边上样；②将样品与重泡胀液混合，在 IPG 胶条泡胀的同时，样品也渗入胶条，然后再加电压。其优点是将泡胀和等电聚焦整合为一个程序完成，保证了重复性。

3. 第一向电泳：固相 pH 梯度等电聚焦

双向电泳技术中，第一向等电聚焦的过程是在固相 pH 梯度胶上进行的，分辨率可达 0.001pH。固相 pH 梯度胶(IPG strip)是由一类具有弱酸或弱碱性质的丙烯酰胺衍生物单体(GE 医疗集团/安玛西亚公司产品的商品名为 Immobiline，Fluka 公司产品的商品名为 pI Select)聚合形成的固相胶条。这类单体是具有下列基本结构的 6～7 种丙烯酰胺衍生物系列：

$$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}R$$

其分子的一端含有一个双键，另一端是一个缓冲基团 R，R 为弱酸或弱碱，p*K*a 从 1.0 到大于 12 不等。几种单体按不同比例混合，可以构成分布在 pH 3～10 的缓冲体系。因此，若根据一定的配方，将各种单体试剂梯度式地加至丙烯酰胺聚合单体中参加聚合，则 R 可通过单体分子中乙烯键的共价聚合镶嵌到聚丙烯酰胺骨架中，形成固相 pH 梯度。为了使操作方便，聚合在塑料薄膜上进行，在洗去引发剂和剩余单体后，将干燥后的胶板切成 3 mm 宽的干胶条，保存于－20℃备用。

由于单体试剂的比例可以随意调配，这样就可以控制生产不同 pH 分离范围的干胶条，其特点为：①pH 梯度稳定，受溶液及电场影响小，重复性好；②机械性能好、重现性好、易处理，而且避免了电渗作用，可以进行特别稳定的 IEF 分离；③分辨率高，可达 0.001pH；④范围灵活：窄带 IPG 用于特定 pH 范围的二次分离；宽带 IPG 可提高碱性蛋白质的分辨率，目前，已有多种商品化的 IPG 干胶条，常用的有 pH 3～10、pH 3～12 的宽范围胶条，pH 4～7、pH 6～11、pH 5～8 的窄范围胶条；⑤上样量大，不同的 IPG 胶条，上样范围有所不同，如表 11.4 所列；⑥平衡时蛋白质不易洗脱，易转移至 SDS 胶。

表 11.4　IPG 胶条的载样量

IPG 干胶条长度	分析型电泳的荷载	制备型电泳的荷载
7 cm	10～100 μg /125 μl	200～500 μg/125 μl
11 cm	50～200 μg /185 μl	250～1000 μg/185 μl
17 cm	100～300 μg /300 μl	1～3 mg/300 μl

目前，第一向等电聚焦大多采用 Amersham pharmacia Biotech 公司的 IPG-phor 或 Bio-Rad 公司的仪器。通常采用的胶条厚度为 0.5 mm，宽 3 mm，pH 范围通常有 3～10、4～7、6～11 几类。

聚焦时间的优化很重要。理论上讲，要获得最好的图谱质量和重复性所需的最佳时间是 IEF 分离达到稳定态所需的时间。聚焦时间太短，会导致水平和垂直条纹的出现。过度聚焦虽然不会导致蛋白质向阴极漂移，但会因为活性水转运而导致过多水在 IPG 胶表面渗出（电渗）而造成蛋白质图谱变性、在胶条碱性端产生水平条纹以及蛋白质丢失。最佳时间的确定需要根据不同的蛋白质样品、上样量、pH 范围和胶条长度通过经验来确定。

4. IPG 胶条的平衡（IPG strip equilibration）

IEF 结束后可马上进行第二向电泳，也可保存在两片塑料膜间于－80℃保存数月。在第二向电泳前一定要进行胶条的平衡，以便被分离的蛋白质与 SDS 完整结合，从而使 SDS-PAGE 顺利进行。建议方案是：用含 2%（*M*/*V*）SDS、1%（*M*/*V*）DTT、6 $mmol \cdot L^{-1}$ 尿素和 30%甘油的 50 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris（pH 8.8）缓冲液先

平衡 15 min，再用 5%（*M*/*V*）碘乙酰胺取代 DTT 后的上述缓冲液平衡 15 min。如果用 TBP 代替 DTT 则只需一步平衡。

5. 第二向电泳：SDS-PAGE

SDS-PAGE 主要用于测定蛋白质亚基的相对分子质量，其原理见第 4 章。

SDS-PAGE 成功的关键之一是电泳过程中，特别是样品制备过程中蛋白质与 SDS 结合的程度。其影响因素主要有 3 个：①溶液中 SDS 单体的浓度，为了保证蛋白质与 SDS 的充分结合，二者的重量比应为 1∶4 或 1∶3；②样品缓冲液的离子强度，常为 10～100 $mmol \cdot L^{-1}$；③二硫键是否完全被还原。

在 SDS-PAGE 中，凝胶浓度的正确选择尤为重要。凝胶浓度太大，孔径太小，电泳时样品分子不能进入凝胶；凝胶浓度太小，孔径太大，则样品中各种蛋白质分子均随着缓冲液流向前推进而不能得到很好的分离。不同相对分子质量范围的蛋白质应选用不同的凝胶浓度。对于蛋白质组这样的具有不同迁移率的多组分样品，使用梯度胶是一种好的选择。梯度胶浓度的选择主要根据样品的特性，如样品的相对分子质量范围、样品组分电泳带的相对位置、感兴趣组分的相对分子质量等。根据这些因子选择梯度形式（线性梯度或指数梯度）和浓度梯度范围，具体内容见第 4 章。

6. 胶上蛋白质的检测

2-DE 分离后，胶上蛋白点通过染色方法进行检测。目前常用的方法有考马斯亮蓝染色法、银染法、负染法、荧光探针标记法。表 11.5 比较了几种常用染色方法的特点。

表 11.5　胶上蛋白质染色方法的比较

	考马斯亮蓝染色	银染	负染	荧光探针标记
优点	染色过程简单；无毒性；染色后的背景及对比度良好；与鉴定兼容	在非放射性染色方法中灵敏度最高；成本较低	专为提高 PAGE 胶上蛋白回收率设计，常用锌染；染色过程快	对蛋白质无固定作用；与质谱兼容性好；线性范围宽
缺点	检测灵敏度低；表达丰度低的蛋白质难以染色	由于该过程中醛类的特异反应，对凝胶酶切肽谱提取较难	灵敏度不够高	SYPRO Ruby 染料成本很高，荧光扫描仪价格不菲

以下，对上述方法做一概要的介绍，同时还介绍一种磷蛋白染色的方法。

1）考马斯亮蓝染色

在蛋白质染色方法中，以考马斯亮蓝（coomassie brilliant blue）染色最为常用。考马斯亮蓝为三苯基甲烷类染料，有 R-250 和 G-250 两种。R-250 的检测灵敏度为 50～100 ng/蛋白点，G-250 的检测灵敏度为 10 ng/蛋白点，二者均能与质谱分析兼容。但是，多数糖蛋白不能被考马斯亮蓝染色。

一种改进的考马斯亮蓝染色法称为胶体考马斯亮蓝染色法（colloidal coomassie staining），该方法可使考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质的碱性氨基酸残基（精氨酸、酪氨酸、赖氨酸、组氨酸）结合且形成胶体状态，大大降低了背景的干扰，改进了 R-250 脱色时间过长的缺点，检测灵敏度为每个蛋白点 8～50 ng。其代表性的操作见文献[20]。

2）银染

银染的机制是将蛋白质带上的硝酸银（银离子）还原成金属银，并使银颗粒沉积在蛋白质带上。在蛋白质组学研究中，有两类银染色的方法：经典银染法（classical silver-staining method）和与质谱分析兼容的银染法（mass spectrometry-compatible silver staining）。

经典银染法有超过 100 种的具体实验方法，有代表性的实验方法又称为氨性银染法（ammonniacal silver staining），检测灵敏度为每个蛋白点 2～4 ng，是检测 SDS-PAGE 胶上蛋白点最灵敏的方法。经典银染法试剂的基本组成为：硫代硫酸钠（sodium thiosulfate，从水中去除氯化物）、戊二醛（glutaric dialdehyde，与蛋白质分子中的氨基反应）、硝酸银、甲醛、EDTA 或乙二胺（用于螯合多余的银离子）。其操作过程复杂，要求配制试剂和洗涤容器必须使用超纯水；所用试剂必须达到高纯度，以避免出现阳性误差；且因试剂中含有的戊二醛和其他的强氧化剂可引起蛋白质的交联而干扰质谱分析，因此与质谱分析不兼容。所以，凡是在蛋白质组学研究中需要进行质谱分析的，都不能用经典银染法对胶上蛋白点进行染色。

与质谱分析兼容的银染法试剂组成中不含有戊二醛，其检测灵敏度低于经典银染法、染色后的背景较深、对某些蛋白质可能出现负染。目前，已有数家公司（如 Amersham Bioscience，Bio-Rad，Pierce 等）有与质谱分析兼容的银染法试剂盒出售，可与 MALDI-TOF-MS、ESI-MS 兼容，在半制备荷载的量级下不会出现负染。其代表性的操作见文献[21]。

3）负染

该技术主要包括金属盐染料、锌-咪唑染料等的使用，能专门提高 PAGE 胶上蛋白质的回收率，但不能用于膜上染色。结果表现为胶面着色而蛋白质点透明。

此技术的优点为:速度快(5～15 min),蛋白质的生物活性能保持。一旦用络合剂如 EDTA 或 Tris/甘氨酸转移缓冲液来络合金属离子就可进行提取来转移蛋白质。它主要适用于蛋白质显色、完整蛋白质的胶上被动提取以及质谱分析。

4) 有机荧光团染料

包括共价结合和非共价结合的荧光团染料两类。后者最为常用,其典型代表是一类商品化的含有钌(Ⅱ)的有机络合物 SYPRO 宝石红(SYPRO Ruby)、SYPRO 橙(SYPRO Orange)、SYPRO 红(SYPRO Red)、SYPRO 橘红(SYPRO Tangerine)。这些种染料可对 SDS-PAGE 胶内蛋白质进行一步染色,约 30～60 min 完成,灵敏度为 2～10 ng。染色后的凝胶用标准的实验室 300 nm 紫外透射仪进行照像保存,其线性范围为 3 个数量级。染色结果与在酵母中通过 SAGE 所获得的基因表达水平的动态范围相匹配。在 Tris/甘氨酸转移缓冲液中染色后,蛋白质可被转移至膜上并进行免疫染色或 Edman 测序来鉴定。

这类金属螯合染料不包含戊二醛、甲醛或吐温-20 等,很容易和集成化蛋白质组学平台(包括自动化凝胶染色仪、图像分析工作站、机器人剪切仪器、蛋白质酶解工作站和质谱仪等)相结合。其染色过程简单,不存在过分染色的问题;动态范围 1～4000;不同蛋白质的染色结果差异较小;适用于糖蛋白、脂蛋白、钙离子结合蛋白等难以用其他染色方法染色的蛋白质;样品中的 DNA/RNA 不干扰染色过程;与 MALDI-TOF-MS 兼容。价格昂贵是其缺点。

5) 以磷酸化蛋白染色试剂盒(GelCode Phosphoprotein Stain Kit)对磷蛋白进行染色的方法[22]

磷蛋白是体内一类重要的调节蛋白,参与了多种细胞生物学过程,因此,对于磷蛋白的检测日益显得重要。Pierce Chemical Company 提供了一种检测试剂盒,它在钙离子存在的条件下,以 NaOH 水解磷蛋白的磷酯键,所生成的磷酸钙以钼酸铵的稀硝酸溶液处理,形成硝基磷酸-钼酸盐复合物(nitrophospho-molybdate complex),最后以甲基绿染色。磷蛋白被染色为绿色或绿-蓝色。检测灵敏度在纳克范围,但是实际检测能力还取决于蛋白质的磷酸化程度。

11.4.2　双向电泳图谱所传达的信息

图 11.7 展示了 2-DE 分离人肝细胞和血浆所得到的结果,横轴是等电点标度(pH 从左至右增大),纵轴是分子质量标度(kDa 由下至上增大)。由双向电泳图可以得到:①蛋白质的分布范围(偏酸性或偏碱性);②表达蛋白质的可能个数(凝胶点的数目);③蛋白质的大概分子质量;④蛋白质的大概等电点;⑤蛋白质相对表达丰度(点的灰度值)等。但是,通过双向电泳分离不能得到完整的功能蛋白质,得

到的是构成蛋白质的各个亚基。

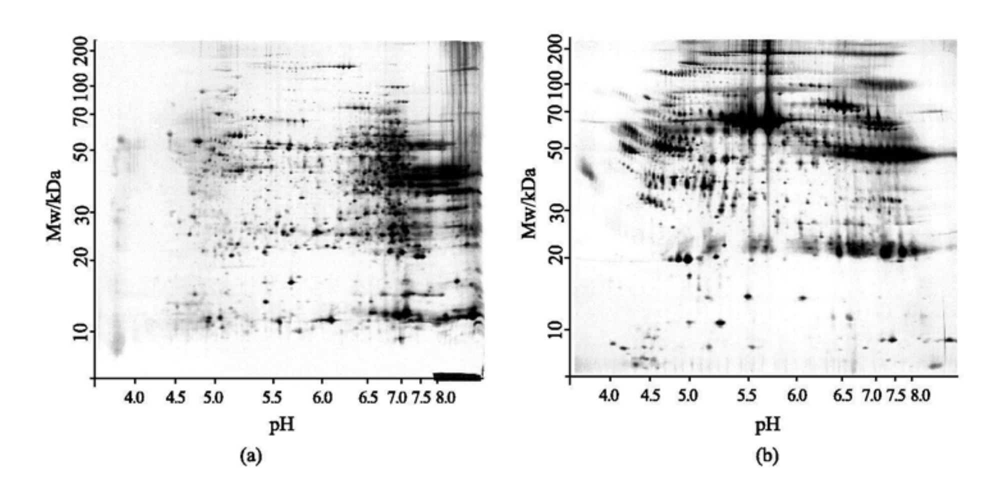


图 11.7　双向电泳例图[23]

(a) 人肝细胞的双向电泳图;(b) 人血浆的双向电泳图

同一种蛋白质的不同修饰形式(如酰胺化与去酰胺化、糖基化、磷酸化、氧化和外源化学修饰等)具有不同的等电点,因此,在 2-DE 图像中处于不同的位置。在某些情况下,相同多肽所表现出的不同修饰形式可能显现为"点横向排列"。这种分离对于鉴别蛋白质的不同存在形式是有用的。

目前,SWISS-2DPAGE 数据库中有大量的经过注释的二维聚丙烯酰胺凝胶电泳数据库参考图可供研究人员利用。这些参考图的样本源于人类[肝、血浆、HepG2、血红细胞、淋巴瘤、HepG2 分泌蛋白、脑脊液、巨噬样细胞系、白血病细胞、血小板、肾、早幼粒白血细胞、结肠上皮细胞、结肠腺癌细胞系(DL-1)、肝组织来源的可溶性核蛋白和基质]、小鼠(肝、腓肠肌、胰岛细胞、脂肪组织、肝组织来源的可溶性核蛋白和基质)、拟南芥、大肠杆菌(7 个等电点范围:3.5~10, 4~5, 4.5~5.5, 5~6, 5.5~6.7, 6~9, 6~11)、酵母和盘基网柄菌属等,而且数据库的内容还在不断更新。SWISS-PROT 数据库可以通过 ExPASy 服务器进入(http://www.expasy.org/ch2d/),以各种关键词[蛋白质的描述、蛋白质名、基因名、物种、作者、全文、蛋白点流水号(serial number)]检索或通过点击图形上的点来查询;也可以通过计算 SWISS-2DPAGE 数据库中每一个蛋白序列或用户输入的氨基酸序列在 SWISS-2DPAGE 参考图中估算定位。这些数据库越来越成为比较不同实验室所产生数据的重要资源,通过数据库软件,能够将大量凝胶图像与一块凝胶或凝胶组进行比较和进行蛋白点变化图型的统计总结。

11.4.3　图像分析技术

“满天星”式的 2-DE 图谱中，每一个斑点的上调、下调及出现、消失，都可能在生理和病理状态下产生，因此，必须依靠计算机为基础的数据处理进行分析。图像分析包括图像采集、背景消减、斑点配比、数据库构建。常用的图像采集系统有电感耦合装置(charge coupled device，CCD)、光密度仪、激光诱导荧光检测器等。无论何种采集系统，都必须具备透射扫描的功能以获得较高的灵敏度。图像采集的信息为光密度值，一般来说，该值与蛋白质点的表达丰度成正比。影响图像采集质量的因素有：扫描系统的分辨率、灵敏度，以及扫描时所选择的图像对比度和明亮度。

双向电泳图像分析要通过软件的运行来实现。软件分析所要做到的有以下几点：蛋白质点数的统计；蛋白质点的定位、编号；相对丰度分析；在进行差异蛋白质组分析时，要对相互对照样品的凝胶图像进行同步分析，比较对应蛋白点的表达丰度，获得差异蛋白质点的缺失、出现以及表达量的变化等信息。目前有多种图像分析软件可以使用，如表 11.6 所列。

表 11.6　用于 2-DE 图像分析的软件工具

软件名称	来源	应用
Fliker	National Cancer Institute(www.lecb.ncifcrf.gov/fliker/)	可视的胶-胶对比
PDQuest	Bio-Rad(www.biorad.com)	凝胶图像比较
Image Mster	Amersham Biosciences(www4.amershambiosciences.com)	凝胶图像比较
DeCyder	Amersham Biosciences(www4.amershambiosciences.com)	2D-DIGE 分析*
Melanie	Genebio(http://www.genebio.com/)	凝胶图像比较
Phoretix/Progenesis	Nonlinear Dynamics(http://www.nonlinear.com/)	凝胶图像比较
Investigator HT Analyzer	Genomic Solutions(http://www.genomicsolutions.com/)	凝胶图像比较
Proteome Weawer	Definiens(http://www.definiens.com/)	凝胶图像比较
Delta 2D	Decodon(http://www.decodon.com/)	凝胶图像比较

* 2D-DIGE：荧光双向差示凝胶电泳

11.4.4　目前双向电泳技术存在的问题

双向电泳虽然是目前蛋白质组学研究中最有效的分离技术，但远不是一种完美的分离技术，还存在以下问题：

(1) 进行可完全重复的 2-DE 分析是困难的。因此，在比较蛋白质组学分析中，对两种不同状态下的 2-DE 图像的比对需要特别小心。

(2) 许多较大的疏水蛋白质在 IEF 分析中的结果不理想。这些蛋白质的低溶解度导致蛋白质沉淀和聚集，在 IPG 胶条中出现影响蛋白质清晰聚焦的“成片条带”。这种 IPG 胶条进行 SDS-PAGE 电泳时，显示为跨越分子质量区域的条纹，从而影响蛋白点的分离。

(3) 对相对分子质量过大(＞100 000)的蛋白质分离分析能力差。主要是由于 IPG 胶条水化时，相对分子质量过大的蛋白质难以进入胶条。

(4) 不易实现自动化操作，因此，尚不能适应大规模蛋白质组分析的需要。

(5) 现有的主要染色技术(考马斯亮蓝染色、银染色)的检测灵敏度较差，且局限在约一百倍的动态范围，而细胞中蛋白质的表达范围约为百万倍。而且，从胶上切割下的蛋白点消化后所产生的肽的回收率常常低于 60%，这更会妨碍 MS 对低丰度蛋白的鉴定。因此，如果不对样品中提取的蛋白质混合物进行细致地分级和富集，双向电泳仅仅是一种适合于长寿命、高丰度蛋白的分离技术。

如图 11.8 所示，若样品中有 100 000 个目标蛋白质拷贝时，胶上荷载的上样量需达到 1mg 才能保证考马斯亮蓝染色斑点的显现，这意味着要从 1×10^{7} 个细胞中提取蛋白质。同样情况下，显现银染色斑点的上样量要达到 100μg 以上，这意味着要从 1×10^{6} 个细胞中提取蛋白质。而对于低丰度蛋白质，如样品中只有 1000 个目标蛋白质拷贝，胶上荷载的上样量需高达 100 mg 才能保证考马斯亮蓝染色斑点的显现，这意味着要从 1×10^{9} 个细胞中提取蛋白质；同样情况下，显现银染色斑点的上样量要达到 10 mg 以上，这意味着要从 1×10^{8} 个细胞中提取蛋白质。由于蛋白质样品不可能像核酸样品那样通过 PCR 扩增，所以，微量蛋白质样品中低丰度蛋白点的检测受到限制。

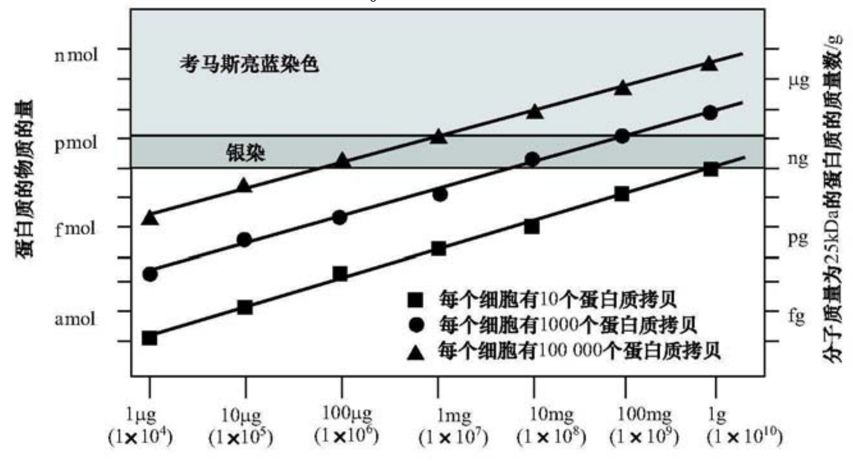


图 11.8 目标蛋白拷贝数与胶上荷载的由细胞提取的蛋白质量的关系[24]

11.4.5　双向电泳技术的改进

针对 2-DE 技术的缺陷，近年来开发出许多基于传统双向电泳技术的改进方法，这些方法的目标主要有两个：①提高分辨率，增加可分离的蛋白点的数目；②提高低丰度蛋白点的可检出程度。

1. 三步提取法

在进行电泳之前，按照蛋白质溶解性能的不同，将样品的蛋白质组成分为 3 个部分后分别进行电泳，如图 11.9 所示。这一流程是由 Bio-Rad 公司提出的，使用了 3 种亲水/疏水性不同的提取液。第一种提取液为 pH 9.5 的 Tris 缓冲液，可将样品中 40%～80%的蛋白质提出；第二种提取液为含有尿素(urea)/CHAPS/两性电解质(Tris Bio-Lyte®)/三丁基膦(tributyl phosphine，TBP)的缓冲液，可将样品中 12%～49% 的疏水性较强的蛋白质提出；第三种提取液为含有尿素/硫脲(thiourea)/CHAPS/SB3-10/Tris Bio-Lyte®/TBP 的缓冲液，可将样品中 5%～8%的疏水性更强的蛋白质提出。这种提取方法将样品中的蛋白质按疏水性加以分类，相应减少了每一次 2-DE 分离的蛋白质数量，提高了分辨率，增加了膜蛋白的分离数量。

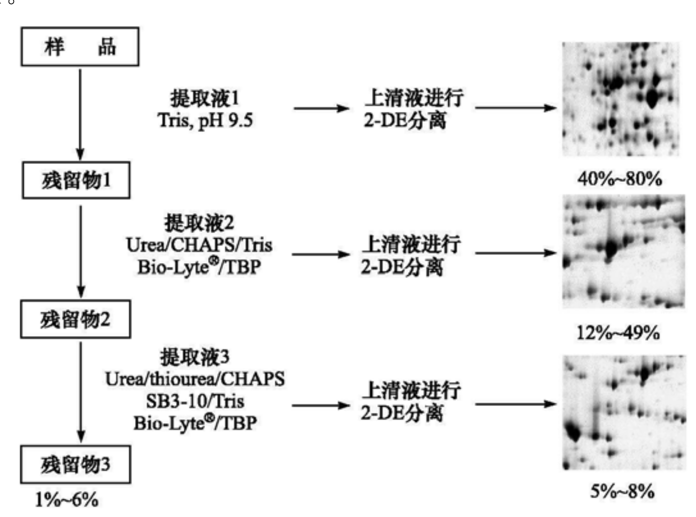


图 11.9　三步提取法流程图

2. 亚细胞器分离

在进行 2-DE 前，先使用高速或超速密度梯度离心的方法，提取各种亚细胞器(如线粒体、细胞核、微粒体、质膜、溶酶体、过氧化物酶体、高尔基体以及胞浆等)，

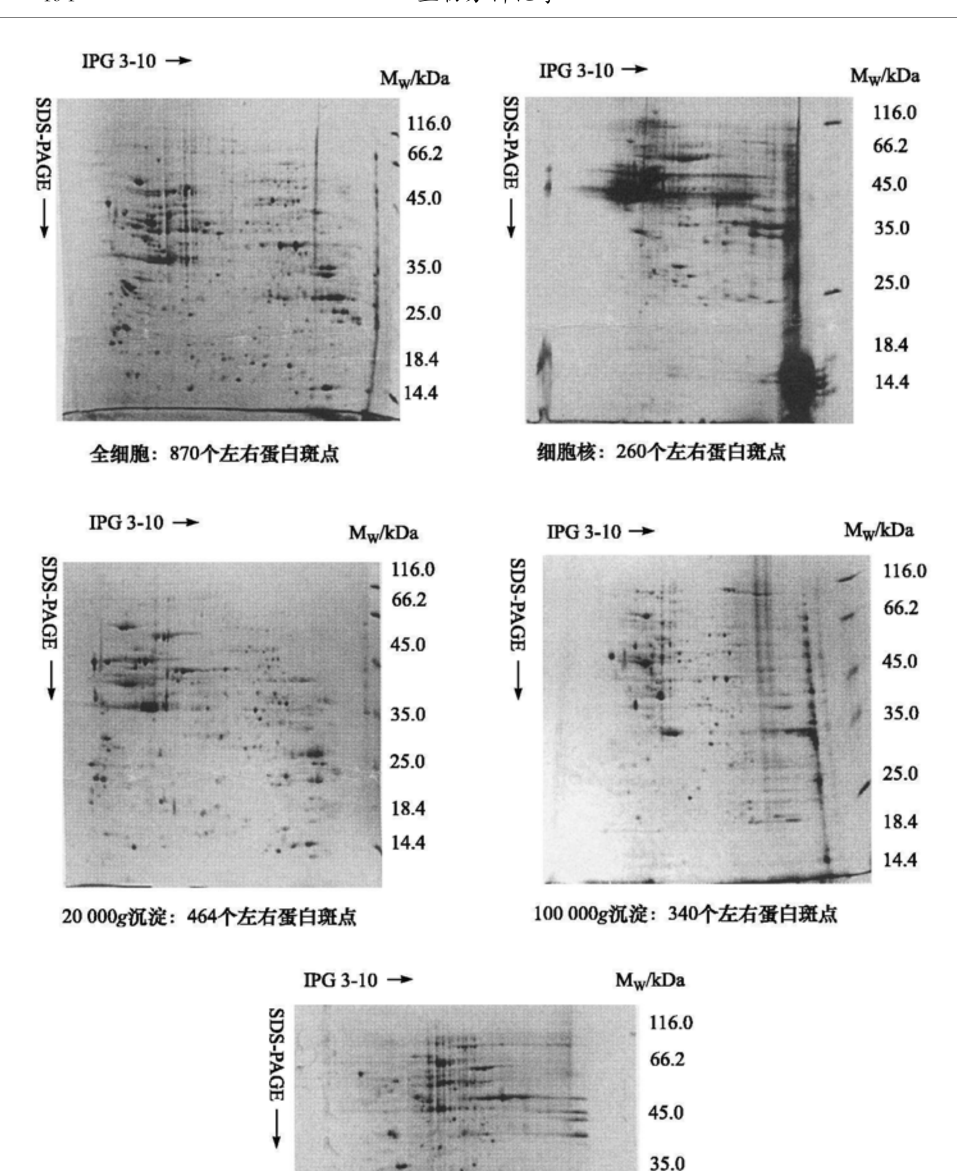


图 11.10　肝癌细胞 QGY-7703 全细胞及细胞核、20 000 *g* 沉淀、100 000 *g* 沉淀、细胞质的双向电泳图

然后再进行 2-DE 分离。该方法的优点为：①增加了蛋白点的分离数量；②可提高低丰度蛋白的检出；③可明确蛋白点的亚细胞定位。在我们对肝癌细胞蛋白质组学进行的研究中，使用 pH 3～10 的 IPG 胶进行 2-DE，得到肝癌全细胞匀浆样品的蛋白点为 870 左右，而将样品分为细胞核、20 000 *g*、100 000 *g* 和细胞质后分别进行 2-DE，所得到的蛋白点总数增加至 1460 个左右(图 11.10)[25,26]。

3. 荧光双向差示凝胶电泳技术

荧光双向差示凝胶电泳(fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis，2-D DIGE)是由 Amersham 公司开发的一种改良技术。它在传统双向电泳技术的基础上，结合多重荧光分析的方法，在同一块胶上共同分离多个分别由不同荧光染料标记的样品。在 2-D DIGE 技术中，每个蛋白点都有它自己的内标，并且软件全自动根据每个蛋白点的内标对其表达量进行校准，保证所检测到的蛋白丰度变化是真实的。这种技术可检测到样品间小于 10％的蛋白质表达差异，统计学可信度达到 95％以上。

2-D DIGE 使用 3 种花青荧光染料：花青染料 2(Cy^2，商品名 CyDye DIGE Fluor Cy™2)(内标)、花青染料 3(Cy3，商品名 CyDye DIGE Fluor Cy™3)(标记蛋白样品 1)、花青染料 5(Cy5，商品名 CyDye DIGE Fluor Cy™5)(标记蛋白样品 2)，它们是 *N*-羟基琥珀酸亚胺衍生物，其荧光特性如表 11.7 所示。

表 11.7　CyDye DIGE 荧光团的特性

荧光团	荧光色	最大激发波长 λ_{max}/nm	最大发射波长 λ_{max}/nm	摩尔吸光系数
Cy2	绿	491	509	135 000
Cy3	橙	553	569	133 000
Cy5	红	645	664	217 000

这一技术的基本操作为：①细胞或亚细胞裂解物按标准方法准备。②等量(25 μg)混合蛋白质样品 1 和蛋白质样品 2 的裂解物，以 CyDye DIGE Fluor Cy™2 染料标记，作为“合并的内标”。③取相同质量的蛋白质样品 1 和蛋白质样品 2 的裂解物(50 μg)，分别使用 CyDye DIGE FluorCy3 或 Cy5 染料标记。④在等电聚焦之前，混合标记好的样品。每一张凝胶包括经 Cy2 标记的“合并的内标”和分别由 Cy3、Cy5 标记的的样品。⑤按标准操作进行双向凝胶电泳。⑥用 Typhoon 9400 可变模式成像仪获取凝胶图像。扫描波长设置为：Cy2(488 nm 激发激光)、Cy3(532 nm 激发激光)、Cy5(633 nm 激发激光)。同一块胶可以得到 3 张扫描图，即：Cy3 图像(蛋白样品 1 的 Cy3 标记图像)、Cy5 图像(蛋白样品 1 的 Cy5 标记图像)、Cy2 图像(Cy2 标记的“合并的内标” 图像)；⑦获取的凝胶图像使用 DeCyder 差异分析软件处理。经过软件过滤后的差异蛋白点应在丰度上表现为统计学意义上的

显著改变(图 11.11)。

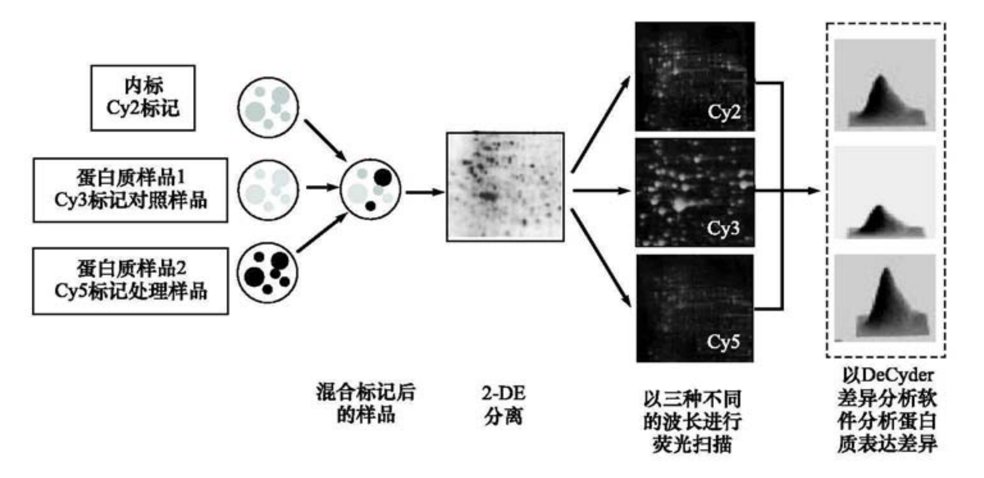


图 11.11　2-D DIGE 的实验流程图

2-D DIGE 的优点为:①两种样品在同一块胶上分离,与传统的 2-DE 方法相比,重现性有了较大的提高,可以更直观地观察两组样品的差异表达;②该方法在 4 个数量级的范围内可以进行蛋白点(带)的定量,动态范围比银染、考染及胶体考染更宽;③操作时间短,标记反应只需要 45 min;④荧光标记不影响质谱分析;⑤检测灵敏度为 0.8 ng/蛋白点(这意味着样品量为 1 g 时,可以在 100 个拷贝/细胞的量级检出蛋白质)。缺点是该方法只适用于含有赖氨酸的蛋白质的标记,对赖氨酸含量少的蛋白质的标记也有困难,大部分未经标记的在谱图上不能显现。

11.5　蛋白质组学分析中的色谱技术及几种分离技术的“杂交”

2-DE 的最大优点是可以得到非常直观的图像图谱,因而便于研究人员根据凝胶上点的图形变化比较蛋白质组的变化。所以,2-DE 可能继续是蛋白质组学研究中主要的分离技术。但是,如 11.4 节所述,对于低丰度蛋白,2-DE 发挥的作用有限,如果凝胶的染色不能显示需收集和分析的蛋白质,则无法使用 MS 来鉴定蛋白质。在这种情况下,色谱技术是很好的替代技术。

11.5.1　多维液相色谱技术

多维液相色谱(multidimensional HPLC,MDLC)技术是指连续使用几种液相色谱分离模式以使复杂混合物中的成分得到更大程度的分离的色谱技术,目前以二维液相色谱为主。

在描述色谱分离体系的参数中，除柱效 n、选择性系数 α、分离度 R 外，还常用到峰容量 m。Giddings 将峰容量 m 定义为：在相邻组分的分离度 $R=1$ 的条件下，在第一个峰和最后一个峰之间所能容纳的色谱峰数。亦即，峰容量 m 表示在色谱图中横坐标 x 的适当距离内，可容纳分离开的谱带的最大数目。多维色谱的总峰容量 m_T 等于每一维色谱峰容量（m_i）的乘积，即：$m_T = m_1 \times m_2 \times m_3 \cdots$。因此，多维色谱分离体系比一维色谱分离体系可提供更高的峰容量，这是适合蛋白质组学的分析要求的[27]。

与 2-DE 相比，多维液相色谱的主要优点为：①有高的选择性，能从含多种未知组分、组成复杂的蛋白质样品中分离出需要的组分；②对于低丰度成分有很好的富集和检出能力；③易于实现自动化操作，分析数据重现性好。

二维液相色谱的基本操作流程是：样品在经过的基础上，利用高压切换阀，把谱图中的某个色谱峰（混合组分峰）的一部分（或全部）选择性地切换到二维色谱柱上进行再次分离。常采用的二维液相色谱分离模式有：离子交换色谱-反相液相色谱、色谱聚焦-反相液相色谱、分子排阻色谱-反相液相色谱、亲和色谱-反相液相色谱等。反相液相色谱因具有高效的分离能力、无盐、便于后续处理而常被作为二维分离体系中的最后一维。

二维色谱分析中，多数研究者多用普通高效液相色谱仪和多通路阀自行组装成二维液相色谱系统。目前，已有商品仪器面世（如 Waters 公司的 Alliance Comprehensive 2D Bioseparations System，Thermo Electron Corp 的`MDLC-LTQ，Amersham Biosciences 公司的 Ettan MDLC 等）。

在蛋白质组学分析中，二维液相色谱技术的应用越来越受到重视。2000 年 Unger[28] 等首先报道了在蛋白质组学研究中使用全二维 HPLC 的研究结果。他们在第一维分离中使用了粒径 2.5 μm 的键合了二乙胺乙基和磺酸基的聚合物作固定相的离子交换柱，流动相流速为 1 ml · min^{-1}；在第二维分离中，平行使用了两支的 ODS 短柱（粒径 1.5 μm，14 mm×4.6 mm i. d.），流动相流速为2.5 ml · min^{-1}，峰的总容量为 600。之后，用于蛋白质组学分析的研究报告日益增多，在 2004 年 Cottingham 发表的综述中[29]，介绍了由组合部件构成的整体蛋白质组学分析系统，提供了包括 Waters、Agillent、Applied Biosystem、Bruker Daltonics、Ciphergen、Biosystem、Proteome System，Inc、Thermo Electron Corp、GE Healthcare、Thermo Electron Collaboration 等公司生产的 11 种用于蛋白质组学研究的仪器系统，其中有 8 种都使用了二维 HPLC 技术。

下面通过酵母蛋白提取物的 MDLC 来说明二维 HPLC 技术在蛋白质组学分析中的应用情况[30]。

图 11.12 的示例中，样品为来自酵母的可溶性蛋白提取物（包括可溶性膜蛋白）。分析的步骤包括：①对这种复杂的蛋白质混合物进行还原和烷基化。②进行

第一维的色谱分离。考虑到样品中蛋白质的多样性，使用了强阴离子交换柱、在pH 10条件下的梯度分离。在这一条件下，几乎所有蛋白质都带负电荷，因而使分离效果达到最好。经第一维色谱分离后，样品被分为8个组分。③对每一个组分分别进行第二维反相色谱分离。每一个组分又收集到12个组分，因此，经第二维色谱分离后，样品被分为96个组分。④对96个组分中的每一个组分分别进行胰蛋白酶酶解。⑤对96个组分中的每一个组分酶解后的肽混合物进行nano RP-HPLC-ESI-MS/MS分析。⑥通过SpectrumMill搜索引擎进行数据库搜索，给出鉴定结果。

为了完成这一工作，用8支色谱柱和两个双通道六通阀组成了一个带有自动进样器的MDLC分离系统。这项工作的第②步需时15 min，第③步总共需时180 min，第⑤步对每一个部分酶解后的肽混合物进行质谱分析需时60 min，整个工作的完成需要六天。

这项研究工作同时还对酵母可溶性蛋白提取物进行了2-DE分析，检测到1000个蛋白点。而用上述MDLC技术路线，一共找到了1150个用于鉴定的色谱峰，最终有500个蛋白质得到鉴定。

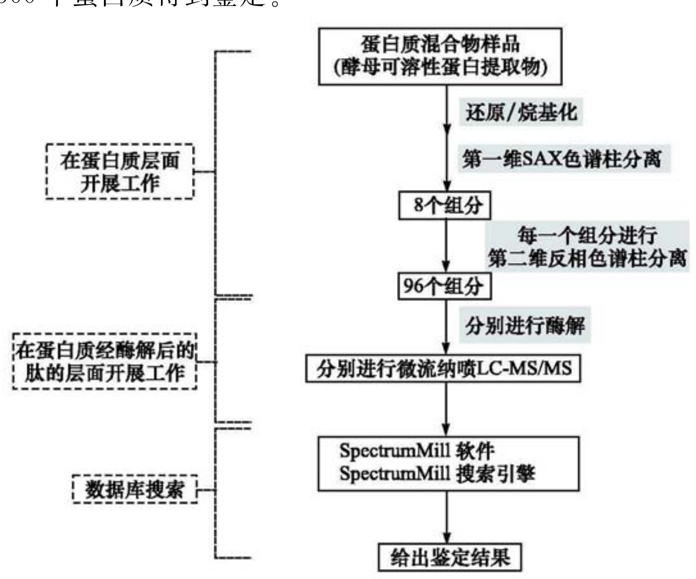


图11.12　酵母可溶性蛋白提取物的MDLC分析

总体来说，MDLC在目前的蛋白质组学分析中是一种与2-DE互补的技术，也有可能是2-DE潜在的替代者。但是，MDLC要完全适应蛋白质组学分析的要求，以下几个方面的改进是必要的：

（1）分离材料。目前所使用的固定相还不能满足对蛋白质组这样的复杂体系

分离的需要，应进一步开发柱效高、柱容量大、生物相容性好、选择性高的各种新型的固定相材料。

(2) 色谱分析速度。用 MDLC 分析蛋白质组的工作量是很大的，因此，提高色谱分析速度显得十分重要。近几年发展起来的整体柱(monolithic silica column)技术可能是提高色谱分析速度的一条途径(见第 3 章)。邹汉法[31]等制备了硅胶基质的 ODS 整体毛细管柱，在此基础上，建立了 μ-HPLC/nanoESI-MS/MS 体系。用这种柱(60 cm×75 μm i.d.)对酵母蛋白(cerevisiae protein)的酶解产物进行梯度洗脱，在 400 min 内分离了 5501 个酶解肽段，并通过质谱分析，鉴定了 1323 种蛋白质。

(3) 在 MDLC 中，建立完善的平行分离模式(parallel separation mode)。这种分离模式旨在实现给定时间区段内高峰容量的快速分离。如用 Amersham Biosciences 公司的 Ettan MDLC 系统分析人血浆样品，为了尽可能多地鉴定样本中的蛋白质，在蛋白质分级这一步，平行使用了三种不同的流程：全血浆酶解产物直接用来做 MDLC 分析(工作流程[1])；使用重组蛋白 G(recombinant protein G)为配基的亲和色谱柱(商品名 HiTrap™ Protein G)去除 IgG(工作流程 2)；先后使用汽巴蓝染料 3G(Cibacron Blue 3G)为配基的亲和色谱柱(商品名 HiTrap™ Blue)去除白蛋白，用 HiTrap™ Protein G 柱去除 IgG(工作流程 3)。在所有的过程中，还原烷基化后的样本都用测序级胰蛋白酶(Trypsin, sequencing grade)酶切，反应条件为在 50 mmol·L^{-1} NH_4HCO_3(pH 8.4)中 37℃孵化 12 h。三种工作流程的起始步骤都是在 2.1 mm BioBasic(r)阳离子交换柱(ThermoHypersil 公司)上样 1mg，流速 200 μl·min^{-1}，每 100 μl 收集一次组分，共收集 50 个组分准备进一步分析。组分的去乙腈浓缩过程通过一步旋转真空干燥完成。随后 50 个组分的进一步分离工作是在同一色谱系统(高通量纳升级液相色谱)上完成。洗脱出的肽段用 Thermo Finnigan LTQ™ 离子阱质谱进行 MS/MS 分析，先是进行全扫描，然后进行 5 个 MS/MS 谱图的扫描。通过这种平行分离模式，使高丰度蛋白得到完全去除，从而鉴定了 316 个低丰度蛋白。

(4) 完善高速 MS 分析策略。MDLC 的瓶颈环节在 MS 分析。目前蛋白质组学分析常用的两种质谱分析方式中，ESI-MS 可以与 MDLC 实现在线联用，且可以适合复杂混合物的分析，但其质量分析器对于离子碎片的分析速度相对较慢；而 MALDI-TOF 不能与 MDLC 实现在线联用，只适合复杂程度较低的混合物的分析，但其质量分析器对于离子碎片的分离速度较快。因此，建立两种质谱分析方式结合并与 MDLC 实现在线联用的分析系统以提高整体分析速度、适应蛋白质组学分析的需要是今后的一个重要发展方向。

11.5.2　几种分离技术的“杂交”

在蛋白质组学的分析工作中，分离是非常关键的一环。因此，除了上述的 2-DE、MDLC 分离技术外，越来越多的研究还采用将各种分离技术混合使用的策略，在有的文献中，将其称为“杂交”的分离途径（hybrid approach for proteome separation）。例如：蛋白质混合物通过制备 IEF、制备 1D-SDS-PAGE 或 HPLC（如亲和色谱）分离整体蛋白质混合物，然后对分离得到的组分进行酶解，所产生的肽在进入 MS 前进行 HPLC 分离。这种策略的优点在于：①利用电泳技术或 HPLC 技术对整体蛋白质混合物进行前端处理的样品量可较大，达到若干毫克；②去除与分析目标不相关的蛋白质，提高 MS 检测低丰度组分的能力。

这种实施路线已在血浆/血清蛋白质组的研究中被采用。血浆/血清一直被公认为是在各种生理状态下产生生物标志物的重要源泉，血浆/血清中所含的蛋白质不仅在数量上最多，达 60～80 $mg \cdot ml^{-1}$、约 10 000 种，而且在单样品中所含蛋白质的浓度范围最宽，至少可达 9 个数量级。因此，从复杂的血浆/血清样品中寻求生物标志物，其关键的第一步是去除样品中占主导地位但不含有特殊生物学信息的高丰度蛋白质，如白蛋白、转铁球蛋白、亲血球蛋白、免疫球蛋白等，浓缩样品中种类繁多的低丰度蛋白质。目前，从血浆/血清中除去高丰度蛋白质的方法主要有亲和色谱法和化学试剂除去法。由人类蛋白质组研究组织（Huma Proteome Organization，HUPO）启动的人类血浆蛋白质组计划（Plasma Proteome Project，PPP）比较了 13 个国家的 35 个实验室去除血浆/血清中高丰度蛋白质的实验结果发现，专用的亲和色谱分离柱具有灵敏度高、重现性好和非特异性键合低、使用寿命长等特点，该技术已成为血浆/血清蛋白质组研究的主要技术手段之一。该技术的优点为：通过去除血浆/血清中的高丰度蛋白质，可以使结合在白蛋白、免疫球蛋白上的低丰度蛋白质解离出来并富集使接下来的 2-DE 图像更加清晰；减少 2-DE 的斑点数，提高对 2-DE 斑点进行质谱分析的准确度；提高 2-DE 上低丰度蛋白质的载容量和大相对分子质量的蛋白质分子的分辨率，提高低丰度蛋白质被识别的几率，尤其是生物标志物识别的几率[32,33]。

11.6　生物质谱在蛋白质组学分析中的应用

生物质谱（bio-mass spectrometry，Bio-MS）着眼于生物大分子的分析与鉴定，是目前蛋白质组学研究中最强有力的鉴定技术平台。从技术层面讲，生物质谱是基于电喷雾技术（electrospray ionization，ESI）和激光解吸技术（matrix-assisted

laser desorption ionization，MALDI）的质谱分析技术。因此，用于大多数蛋白质组学质谱分析的仪器有两种类型：MALDI-TOF 质谱仪和 ESI 串联质谱仪。这两种类型的仪器以完全不同的方式工作，产生不同的但是互补的信息。有关这两类仪器的工作原理已在第 5 章做了介绍，本节着重介绍生物质谱在蛋白质组学分析中的应用。

在蛋白质组学的研究中，生物质谱可以开展 3 个方面的基础工作：

（1）以 MALDI-TOF-MS 或 ESI-MS 精确测定完整蛋白质或肽的相对分子质量；

（2）以 MALDI-TOF 进行肽质量指纹谱的测定，这是利用质谱测定由一种蛋白质酶解出的一组肽产物的技术；

（3）以 ESI-MS/MS 或 ESI-Q-TOF-MS 进行肽序列的分析，这是测定一种蛋白质酶解出的一组肽产物中一种（或多种）肽的质量碎片谱图的技术。

11.6.1　精确测定完整蛋白质或肽的相对分子质量

生物大分子相对分子质量的准确测定对鉴定蛋白质是非常重要的。经典的测定蛋白质或多肽相对分子质量的方法有渗透压法、黏度法、光散射法、超离心法、凝胶层析法及电泳法等。这些方法对样品的消耗量大，精确度低，分析时间长。采用质谱方法具有快速、准确、样品消耗量小的特点，是目前灵敏度最高的方法。

1. MALDI-TOF-MS 测定相对分子质量

（1）MALDI-TOF-MS 测定相对分子质量使用线性模式或反射模式。待分析样品与基质（matrix）混合后，将样品和基质的混合物点到样品板上，在空气中干燥。离子源装有激光器向混合物发射光束（一般为 337 nm 激光），基质化合物吸收射线光子形成激发电子，多余的能量转移到样品中的蛋白质或肽片段中，使它们从靶表面射入气相。对于蛋白质或肽，MALDI 方式主要通过获取或失去一个质子而产生单电荷离子，因此，所形成的正离子和负离子分别是$[M+H]^+$和$[M-H]^-$离子，正离子常常是我们感兴趣的离子。正离子和负离子的产生取决于样品的性质。离子一经形成，即通过离子提取过程进入 TOF 质量分析器直接测定准确的相对分子质量。

（2）MALDI-TOF-MS 对分析样品的要求。在样品中，许多常用的试剂与 MALDI-TOF 分析是兼容的，但应注意控制其浓度。如：尿素、盐酸胍、DTT、Tris 缓冲盐、碳酸铵以及碱金属盐等的浓度最大可到 0.5 mol·L^{-1}；磷酸缓冲盐的浓度不能超过 10 mmol·L^{-1}；甘油的浓度不能超过 1%；大部分去污剂的浓度不能

超过 1%,而 SDS 的最大浓度不能超过 0.01%。为了抑制基质的离子化,样品溶液的 pH 应控制在 4.0 以下,如果发现 pH 偏高,可加 0.1%三氟乙酸(trifluoroacetic acid,TFA)进行调节,但是不能使用非挥发性酸调节 pH。

(3) MALDI-TOF-MS 分析中的基质选择。在 MALDI-TOF 分析中,基质的选择会影响离子的形成,不同种类的基质适合不同的样品。蛋白质组学分析中常用的几种基质的适用对象、精制和溶液配制方法介绍如下:

α-氰基-4-羟基肉桂酸(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid,CHCA)

① 适用的分析对象:分子质量小于 10 000 Da 的肽、蛋白质酶解物、小蛋白质分子、肽核酸(peptide nucleic acid,PNA)等。

② 重结晶:将 CHCA 溶于温热的乙醇中至饱和,过滤,加两倍体积冷水,在 4℃条件下放置 24 h 或更长,过滤,以冷水结晶,置空气中或冷冻干燥器中干燥。

③ 溶液的基本制备方法:以含有 0.1%三氟乙酸的 50% 乙腈配制 10 $mg \cdot ml^{-1}$ 溶液备用。

3,5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸(3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid;sinapinic acid,SA)

① 适用的分析对象:蛋白质、分子质量大的肽。

② 溶液的基本制备方法:以含有 0.1%三氟乙酸的 30% 乙腈配制成浓度 10 $mg \cdot ml^{-1}$ 的溶液或在同样溶剂中配成饱和溶液备用。乙腈浓度可增加至 50%~70%,视样品情况而定。

2,5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, gentisic acid,DHB)

① 适用的分析对象:小分子、磷酸化肽、中性碳水化合物、某些合成高聚物。

② 溶液的基本制备方法:以水或 50% CAN 或其他与被分析物相容的溶剂配制成浓度 10 $mg \cdot ml^{-1}$ 的溶液备用。

超级 DHB["Super DHB"(DHB + 10% 5-甲氧基水杨酸 5-methoxysalicylic acid)]

① 适用的分析对象:蛋白质、糖蛋白、糖脂。

② 基质溶液的基本制备方法:该溶液由两种基质配制而成,溶液 A:以 20% 乙腈配成 10 $g \cdot L^{-1}$ DHB 溶液;溶液 B:以 50% 乙腈配成 10 $g \cdot L^{-1}$ 5-甲氧基水杨酸溶液;A、B 两种溶液按 9∶1混合。

(4) MALDI-TOF-MS 分析中的质量校正。在 MALDI-TOF 分析中,获得精确的质量是非常重要的,使用精确度不同的质量数据在数据库进行检索时,所得到的结果有很大的不同。在表 11.8 中,对于理论值 m/z 为 1975.954 的分子离子,测定误差为 1000 ppm 时,从 52 205 个所有种类蛋白质中检索出来的蛋白质数是 754,从 3653 个酵母蛋白质中检索出来的蛋白质数是 173,这无疑大大增加了后续

工作的难度;而测定误差为 10 ppm 时,从 52 205 个所有种类蛋白质中检索出来的蛋白质数是 44,从 3653 个酵母蛋白质中检索出来的蛋白质数是 6。显然,检索命中的蛋白质数越少,检索结果的可信度越高。

表 11.8 肽质量准确度与蛋白质数据库检索结果*

分子离子	误差/ppm	匹配蛋白质数	
		所有种类[a]	酵母[b]
1975.954	1000	754	173
	100	200	76
	10	44	6
1562.884	1000	982	120
	100	197	27
	10	19	2
1055.541	1000	1300	173
	100	514	76
	10	87	6

* 通过 http://prospector.ucsf.edu 网址用 MS-FIT 程序进行检索

a:所有种类蛋白质为 52 205 个; b:酵母蛋白质为 3653 个

因此,在 MALDI-TOF-MS 分析中,必须重视质量校正的工作。质量校正常用内标法、外标法或酶的自切峰进行。作为好的内标肽段有以下的要求:①最好有两个肽(两点法);②质量不要在大多数的肽段范围内(1200~2500 Da);③内标的量要与样品的量成比例;④对其他肽段离子化的抑止要小。目前,常用于校正的标准物质见表 11.9。

用胰蛋白酶的自切峰进行两点或单点校正也是一种可以选择的方法($[M+H]^+$,猪胰蛋白酶的自切峰为:842.5100、1045.5642、2211.1046、2283.1807、2299.1756、2239.1359、2807.3000;牛胰蛋白酶的自切峰为:805.4167、906.5050、1153.5741、2163.0570、2273.1600、2289.1649、2530.3339)。

表 11.9 用于 MALDI-TOF-MS 分析质量校正的标准物质

标准物质	与基质混合时的浓度/($pmol \cdot \mu l^{-1}$)	电荷数	平均质量	单同位素质量
去精氨酸缓激肽 (Des-Arg^1-Bradykinin)	1.0	+1	905.05	904.4681
血管紧张素 1 (angiotensin 1)	1.3 或 2.0	+1	1 297.51	1 296.6853
谷氨酸血纤维蛋白肽 (Glu^1-Fibrinopeptide B)	1.3	+1	1 571.61	1 570.6774
神经加压素(neurotensin)	50	+1	1 673.96	1 672.9175

续表

标准物质	与基质混合时的浓度/(pmol·μl^{-1})	电荷数	平均质量	单同位素质量
促肾上腺皮质激素释放激素 1-17［ACTH (1-17 clip)］	2.0	+1	2 094.46	2 093.0867
促肾上腺皮质激素释放激素 18-39［ACTH (18-39 clip)］	1.5	+1	2 466.72	2 465.1989
促肾上腺皮质激素释放激素 7-38［ACTH (7-38 clip)］	3.0	+1	3 660.19	3 657.9294
牛胰岛素(Insulin，bovine)	3.5 或 0.5	+1	5 734.59	5 730.6087
	—	+2	2 867.80	2 865.8083
硫氧还蛋白(大肠杆菌表达)(Thioredoxin，E. coli)	2.75	+1	11 674.48	—
	—	+2	5 837.74	—
脱辅基红蛋白(马)(Apomyoglobin，horse)	4.0	+1	16 952.56	—
	—	+2	8，476.78	—

在实际样品的 MALDI-TOF-MS 谱图中，有些信号可能是其他污染蛋白所引起的，最常见的是由于不小心操作而污染的角蛋白所产生的信号，它们也会因酶解而产生多个肽的片段峰。在进行数据检索之前，应注意将这些干扰峰删除。

2. ESI-MS 测定相对分子质量

ESI 与 MALDI 不同，前者是蛋白质或肽在固相状态下与基质混合后进行质谱分析，后者则是将蛋白质或肽溶解形成水溶液后进行质谱分析。水溶液中的蛋白质或肽因氨基酸残基上的可电离基团的电离而以离子的形式存在。例如，羧基在 pH<3.0 时质子化(非电离的)、在 pH>5.0 时电离；N 端氨和组氨酸氮是弱碱，在 pH<7.0 时电离；赖氨酸和精氨酸的氮功能基团通常在 pH<8.5 时电离。因此，电荷数目及分布是受溶液 pH 影响的，在酸性(pH 3.5 或更低)溶液中，蛋白质或肽带有总的净正电荷；而在碱性溶液中，蛋白质或肽带有总的净负电荷。在 ESI-MS 分析中，由于带正电荷的蛋白质或肽容易形成，所以，质谱分析大都以正离子模式进行。

在 ESI 条件下，能与多肽或蛋白质分子结合的质子数，也就是正电荷数，由分子中所含碱性氨基酸(Arg，Lys，His)总数和 N 端氨基数决定。一般来说，一个 20 kDa 的蛋白质在溶液中可接受 10～30 个质子，大于 20 kDa 的蛋白质在溶液中可接受的质子数量还会增多。蛋白质和多肽形成多电荷离子的特性使分析质量范围在 2～4 kDa(m/z)的四极杆和离子阱质量分析器可用于生物大分子的分离。表 11.10 列出了几种蛋白质在进行 ESI-MS 时所出现的多重电荷数。

ESI-MS 图不能直接获得蛋白质的相对分子质量信息，必须通过一个重组的过程，即用计算机软件处理多电荷谱图的原始数据，求算相对分子质量。常用的是 Mann 等建立的“平均算法”[34]。该算法利用蛋白质正离子的 ESI-MS 谱计算其相对分子质量是基于两个假定：①在一个多电荷离子系列中，相邻峰值相差 1 个电荷；②电荷是由阳离子的加成(通常为质子)所致。显然，多电荷谱图的分辨率越高，重组所得的结果越准确。为了保证重组结果的可靠性，还需注意：①用于计算的多电荷峰的分布形状，随着电荷的减少，由低丰度向高丰度再向低丰度变化；②该算法需要有至少 4 个以上的多电荷离子方能保证准确。为了得到代表实际蛋白质的质谱图，Mann 等还建立了称为“去卷积”的数据处理方法将多电荷离子质谱图转换成只有单个质量信号的质谱图，如图 11.13 所示。

表 11.10　几种蛋白质的多重电荷数

蛋白质	相对分子质量	浓度/(μmol · L^{-1})	电荷数	质量范围(m/z)
胰岛素	5730	1.7	4～6	950～1450
细胞色素	12 400	1.35	12～21	550～1100
溶菌酶	14 300	0.35	10～13	1100～1500
肌红蛋白	17 000	29.5	16～27	600～1100
α-糜蛋白酶原 A	25 700	19.0	17～22	1100～1500
乙醇脱氢酶	39 800	12.5	32～46	800～1300
α-淀粉酶	54 700	1.8	35～58	880～1550
伴清蛋白	176 000	0.22	49～64	1200～1500

在 ESI-MS 分析中，质量校正也很重要。校正标样有多种，其中一种是肌红蛋白(马或牛)。肌红蛋白(myoglobin)相对分子质量理论值为 16 950.7，含有 153 个氨基酸，其中碱性氨基酸有 33 个，因此，它的质谱可提供丰富的多电荷离子信息。

11.6.2　用肽质量指纹谱鉴定蛋白质

肽质量指纹谱(peptide mass fingerprinting，PMF)是指蛋白质被酶切位点专

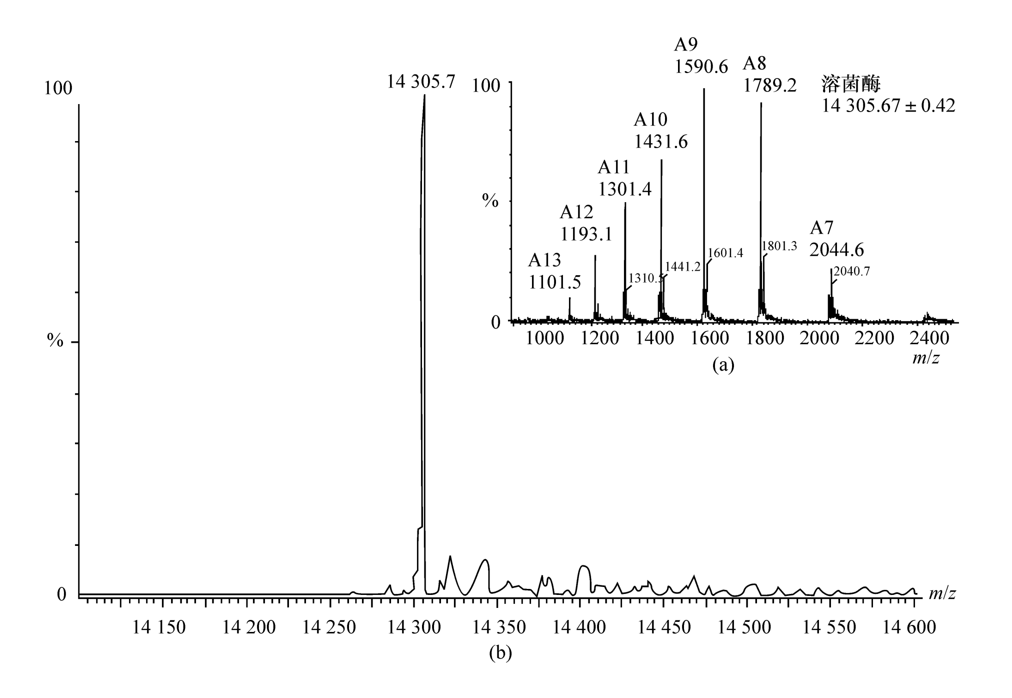


图 11.13　溶菌酶的 ESI-MS 质谱图

（a）是溶菌酶的多电荷离子质谱图；（b）是经“去卷积”数据处理的重组质谱图，溶菌酶的相对分子质量为 14 305.7。从重组谱图中可以看出，该相对分子质量峰有一定的宽度，这是由于同位素峰的影响造成的

一的蛋白酶水解后得到的肽片段质量图谱，由于具有特征性，所以称为指纹谱。PMF 可用于蛋白质的鉴定，即用实验测得的蛋白质酶解肽段质量数在蛋白质数据库中检索，寻找具有相似肽指纹谱的蛋白质。

1. 肽质量指纹谱的基本实验步骤

肽质量指纹谱的基本实验步骤包括：①2-DE 胶上切下需要鉴定的未知蛋白点，脱色；②酶切；③肽提取及 MALDI-TOF 质谱分析；④数据库检索、鉴定蛋白质。

图 11.14 是用肽质量指纹图鉴定蛋白质的基本流程图。选用 PMF 鉴定蛋白质的原因有以下几点：

（1）在 MS 分析中，蛋白质的质量越大，绝对误差越大。这些误差会引起很高的不确定性。而且，各种翻译后修饰使质量测定更为复杂。

（2）不是所有的蛋白质都能进行完整蛋白质的质量测定，如 MS 对大分子蛋白质和疏水蛋白质的测定就比较困难。

（3）现代 MS 仪器可以对肽进行高精度的质量测定，也能得到序列数据，测定灵敏度要远高于对完整蛋白质的测定灵敏度。

（4）目前的数据库检索算法是建立在蛋白水解酶在特定位点将蛋白质切割成肽的基础上的，因此，PMF 所得到的结果可以直接与蛋白质和核酸序列数据中的蛋白质序列进行比较，鉴定蛋白质的身份。因此，可以认为，用肽质量指纹图鉴定蛋白质是目前蛋白质组学研究中的核心技术之一。

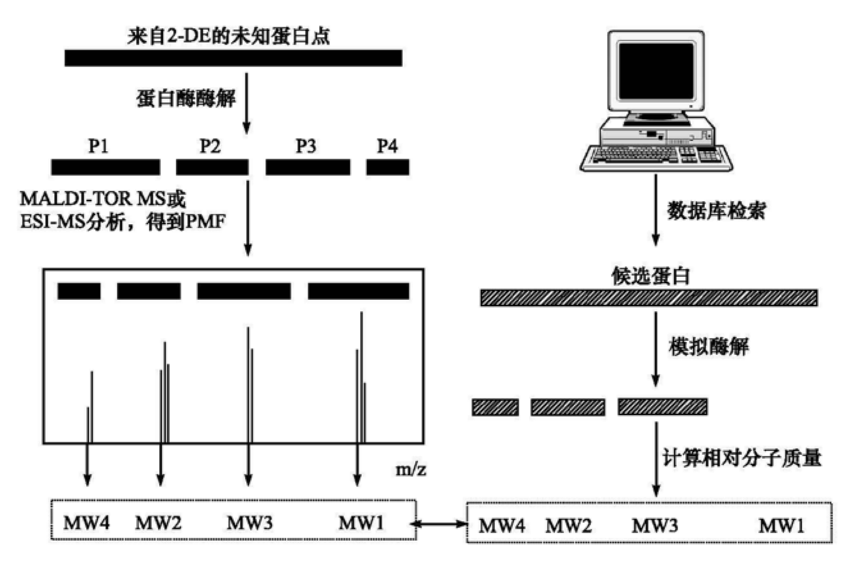


图 11.14　用肽质量指纹图鉴定蛋白质的基本流程图

2. PMF 分析中所用的蛋白酶

在 PMF 分析中，使用蛋白酶的目的是尽可能多的获得合适长度的肽片段供 MS 分析。含有 6～20 个氨基酸残基的肽片段适合于 MS 分析和数据库比较。氨基酸残基少于 6 个的肽太短，不能在数据库检索中产生唯一的序列匹配；而氨基酸残基多于 20 个的肽，难以获得序列信息。

对用于 PMF 的酶的一般要求是：易得、纯度高、稳定性好，为提高 PMF 检索数据库的准确性，产生肽谱的酶切点至少要有两个。在蛋白质组学分析中，常用的酶有胰蛋白酶和 V8 蛋白酶（Glu-C）。

胰蛋白酶（trypsin）：胰蛋白酶在赖氨酸和精氨酸残基位点切割蛋白质，但若在赖氨酸或精氨酸的 C 端方向有脯氨酸则不能切割。这种“双专一性”意味着胰蛋白酶可以比只识别一个氨基酸残基的蛋白酶更频繁地切割蛋白质。

胰蛋白酶的优点为：①赖氨酸和精氨酸在许多蛋白质中的距离能产生长度很适于 MS 分析的肽，一般规律是一个 50 kDa 蛋白质产生约 30 个胰蛋白酶肽。因

此,使用胰蛋白酶常常能够获得“理想的”肽段。②胰蛋白酶可以在一个宽的 pH 范围和温度范围内工作,在溶液和在凝胶中进行消化都有很好的活性,因此,适合于在溶液、凝胶中或膜印迹上消化蛋白质。③兼容性好,可与 Coomassie®、SYPRO® Orange、SYPRO Ruby 和 ProteoSilver™ 染色胶兼容。④适用于 MALDI-TOF-MS 和 HPLC-MS 分析。⑤自切峰可用于质谱校正。

Glu-C:Glu-C 是内切蛋白酶,它在乙酸铵或碳酸氢铵缓冲液中切割谷氨酸残基的羧基侧,但在磷酸钠缓冲液中切割谷氨酸和天冬氨酸残基。与胰蛋白酶相比,Glu-C 有明显不同的切割专一性,这对分析具有高赖氨酸和精氨酸区域的蛋白质可能特别有用。因为这些区域能被胰蛋白酶充分切割而产生没有足够序列信息的极短的肽片段。

3. PMF 的数据库检索

PMF 所提供的是蛋白质经酶解后所得到的肽混合物的精确质量数据。要完成蛋白质的鉴定,还需要利用这些数据通过数据库检索寻找匹配的蛋白质。开展数据库检索的基础是:①数据库的选择;②肽质量指纹谱软件工具的选择与利用。常用的软件有 Mascot、Peptide Search、MS-fit、ProFound 等。有关数据库检索的具体内容见第十三章。

4. 影响 PMF 结果的因素

要获得好的 PMF 谱图,应注意以下影响因素:

(1) 灵敏度。能否灵敏地获得 PMF 信号是后续分析的基础。

(2) 可检测到的肽段少,对数据库检索是不利的。

(3) 精确度。目前,MALDI-TOF-MS 的分子质量精确度可达到 5 ppm 左右,已经完全符合数据库检索的要求,但是,在实际工作中,尤其是微量样品,或从胶内酶解获得的样品精确度往往不够理想,在很大程度上会影响检索结果。误差越大,检索准确性越低。

(4) 质量校正是实验中必不可少的一步。尤其是对 TOF 质量分析器,质量校正非常重要而且须常规进行。

(5) 分辨率。分辨率在一定程度上与精确度相关,尤其当肽段分子质量在 2000 Da 以上时。

(6) 数据库。由于 PMF 鉴定蛋白质是依赖数据库的,因此,数据库本身是否完善和准确也是关键因素之一。

(7) 样品制备。对于质谱分析而言,去除在前一级操作中所带来的各种试剂的残留是很重要的。已有的研究工作表明[35],对质谱分析有严重干扰的物质有甘油、叠氮钠(sodium azide)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)、十二烷基磺

酸钠、磷酸盐、氯化钠、2 mol · L^{-1} 尿素、2 mol · L^{-1} 胍等；可以容忍但需要注意的物质有：*N*-(2-羟乙基)哌嗪-*N*′-2-乙烷磺酸{2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid，HEPES}、3-(*N*-吗啉基)丙磺酸(3-morpholinopropanesulfonic acid，MOPS)、三-(羟甲基)氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane，Tris]、辛-β-D-吡喃葡萄糖苷(octyl-β-D-glucopyranoside)以及乙酸铵等，对于这些物质，应尽量降低使用浓度；三氟乙酸、甲酸、巯基乙醇、二硫苏糖醇、挥发性有机溶剂、盐酸、氨水、乙酸等则没有明显的干扰。对于上述严重干扰物质的控制，将会有效地改进 MALDI-TOF MS 基质的结晶状态，从而获得好的质谱图。

11.6.3　用串联质谱分析肽序列和鉴定蛋白质

PMF 是鉴定蛋白质的一种简单、可行的分析策略，在目前的蛋白质组学分析中，许多工作可以通过这一策略来完成，因此，PMF 的相关技术已为许多实验室所必备。但是，PMF 也存在局限性。

第一，人类和其他研究较为深入的物种的基因组蛋白质组序列数据库还不十分完善和准确，因而降低了可获得的匹配数据的质量。

第二，高等生物中(如人、鼠)存在的大量高度同源蛋白质使其 PMF 谱图非常复杂，从而增加了搜索的难度。

第三，PMF 主要用于蛋白质鉴定，不可能获得肽序列和肽修饰位点的信息。

例如，人血红蛋白 α 链的胰蛋白酶消化产生 14 个胰蛋白酶酶解肽，其中，序列为 VGAHAGEYGAEALER 肽的 $[M+1]^+$ 单同位素精确质量(m/z)为 1529.734 8，而来自小鼠的血红蛋白 α 链的 *I*G*G*H*G*AEYGAEALER 肽有 4 个氨基酸与之不同，其 $[M+1]^+$ 单同位素精确质量也是 1529.348，PMF 技术没有能力对这种序列的不同加以辨认。

因此，对于难以通过 PMF 得到满意结果的，则需要通过 ESI-MS/MS 分析来进行蛋白质的鉴定。

ESI-MS/MS 测序的关键步骤是在多肽一级质谱的基础上，选择母离子(parent ion)，通常是 $[M+H]^+$ 或 $[M+nH]^{n+}$ 离子，使之进一步发生解离，得到更小的碎片离子，根据碎片离子之间的质量差来“拼接”、“复原”肽类分子的构成，从而进行氨基酸序列的推测。

1. 碎片离子的产生模式

产生碎片离子常采用碰撞诱导解离(collision induced dissociation，CID)、碰撞活化解离(collision active dissociation，CAD)、源后衰变(post-source decay，PSD)等模式。

1）CID 模式

在该模式中，离子经过电喷雾源，在进入质量检测前，施加一定的电压，将使离子的运动速度大大提高，当离子与中性分子撞击时，将发生如下的离子反应：

$$A^{+} + N \longrightarrow (A^{+})^{*} \longrightarrow B^{+} + C^{+} + D^{+}$$

式中，A^{+} 为所选出的单一的母离子（precursor）；N 为中性分子，如 Ar、N_2 等；$(A^{+})^{*}$ 为激发态离子；B^{+}、C^{+}、D^{+} 为母离子产生的碎片离子。

CID 模式较为简单且易于操作，但该模式产生的碎片离子较为复杂。尤其是在 LC-MS 中，由于溶剂的干扰及样品分离的不彻底，CID 谱图常是多个分子离子的碎片谱图，这给 CID 谱图的解析带来一定的难度。

2）CAD 模式

CAD 模式的原理与 CID 是一样的，主要不同的是 CAD 采用串级质谱来实现分子离子产生碎片离子的过程。目前常用的串级质谱仪器是三级四极杆（triple quad）质谱仪和 Q-TOF 质谱仪，在其碰撞池或在离子阱中，离子与中性气体分子碰撞吸收能量而导致裂解。图 11.15 表示了在三级四极杆质谱仪中发生的裂解过程。第一级质量分析器选出单一的母离子进入碰撞反应池 Q2（第二级质量分析器），与池内的中性气体分子发生碰撞而产生更小的离子碎片，离子碎片在第三级质量分析器分离后被检测。

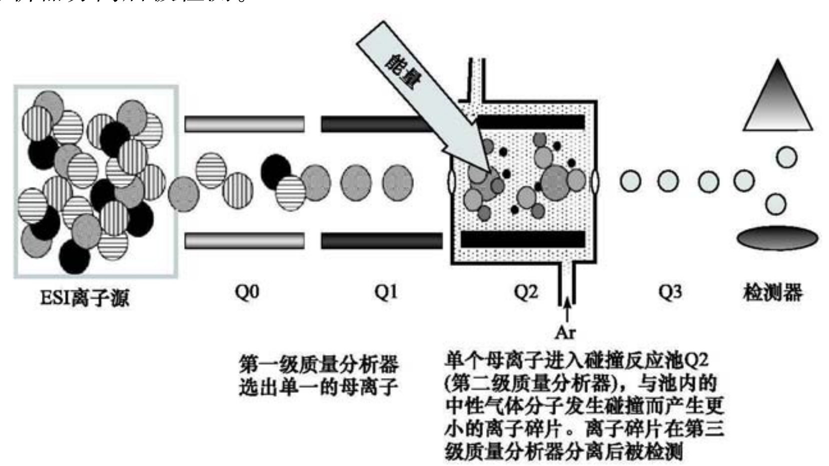


图 11.15　串联质谱 CAD 分析示意图

3）PSD 模式

PSD 模式是常用于反射式飞行时间质谱的一种碎片产生模式。碎片离子因

质量的不同,具有不同的动能,从而导致在反射场中的行为不一样。因此,可以通过调节反射器的电压来探测动能不一致的离子最终飞向检测器时间的不同来检测碎片离子。在肽的 PSD 图中,出现具有基本公式 $H_2N^+=CHR$(R 为氨基酸残基的侧链)的肽亚氨离子,这些亚氨离子是存在特定氨基酸的标志,可在某些软件工具的帮助下鉴定肽序列。但是,这一类信息对于蛋白质鉴定而言有局限性,不如 ESI-MS/MS 所提供的信息全面、可靠。目前较为常用的是使用串级质谱来探测碎片离子,即 CAD 模式。

2. MS/MS 中的肽离子裂解

在 CAD 中,选出单一的肽的母离子经高流速惰性气体碰撞而发生解离,肽链中的许多键都有可能断裂,但主要是形成肽骨架的键的断裂。断裂的类型有 3 种(图 11.16):

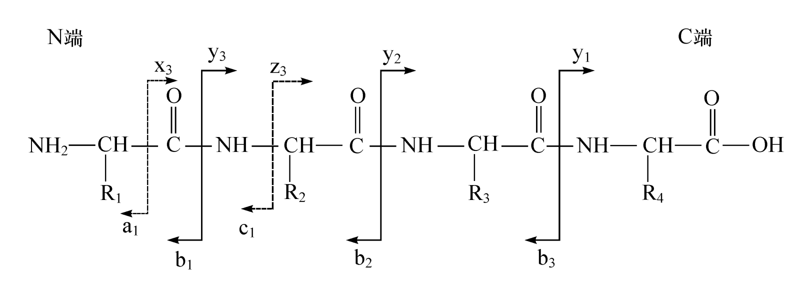


图 11.16　肽的串联质谱碎片离子示意图

蛋白质多肽主链开裂的主要方式有三种,即:a/x 、 b/y 和 c/z 的成对出现。一般而言,b/y 开裂产物的丰度较高,a/x 开裂在许多蛋白质的开裂中也占有主导地位,而 c/z 开裂则较少出现

(1) 酰胺键断裂,形成 b 离子、y 离子。b 离子是电荷保留在 N 端的片段,y 离子是电荷保留在 C 端的片段。当母离子带有双电荷时,有可能产生一系列 b 离子和相应的 y 离子。例如,图 11.17 是一个带有双电荷的十二肽离子$[SPAFDSIMAETLF]^{2+}$在发生酰胺键断裂时,可能产生的 b、y 离子系列(按碎片离子由小到大依次编号)。从 N 端(左侧)逐渐向 C 端(右侧),可以看到裂解产生了一系列 m/z 值逐渐升高的 b 离子片段和一系列互补的 m/z 值逐渐降低的 y 离子片段。每个片段带有单电荷。

以上是母离子带有双电荷时的情况。若母离子带有单电荷,则只形成一种 y 离子或一种 b 离子。此时,母离子的另一半不带电荷,在质谱中作为中性片段丢失。

在正离子模式中,碎片离子的电荷由肽链中的碱基(来自赖氨酸、精氨酸、组氨酸以及 N 端氨基)携带。负离子模式中,电荷将由谷氨酸、天冬氨酸和 C 端羧基携带。

正离子质量数	b离子		y离子	正离子质量数
87.1	S	(b_1)	PAFDSIMAETLF(y_{12})	1323.6
185.2	SP	(b_2)	AFDSIMAETLF(y_{11})	1226.4
256.3	SPA	(b_3)	FDSIMAETLF(y_{10})	1155.4
403.5	SPAF	(b_4)	DSIMAETLF(y_9)	1008.2
518.5	SPAFD	(b_5)	SIMAETLF(y_8)	893.1
605.6	SPAFDS	(b_6)	IMAETLF(y_7)	806.0
718.8	SPAFDSI	(b_7)	MAETLF(y_6)	692.3
850.0	SPAFDSIM	(b_8)	AETLF(y_5)	561.7
921.1	SPAFDSIMA	(b_9)	ETLF(y_4)	490.6
1050.2	SPAFDSIMAE	(b_{10})	TLF(y_3)	361.5
1151.3	SPAFDSIMAET	(b_{11})	LF(y_2)	260.4
1264.4	SPAFDSIMAETL	(b_{12})	F(y_1)	147.2

图 11.17 带有双电荷的[SPAFDSIMAETLF]$^{2+}$可能产生的 b、y 离子系列

（括号内为离子片段的质量数）

(2) 羰基碳原子与相邻的 α 碳原子间的 C—C 键断裂,形成 a 离子、x 离子。a 离子是电荷保留在 N 端的片段,x 离子是电荷保留在 C 端的片段。

(3) 酰胺氮原子与相邻的 α 碳原子间的 N—C 键断裂,形成 c 离子、z 离子。c 离子是电荷保留在 N 端的片段,z 离子是电荷保留在 C 端的片段。

在三级四极杆质谱仪、Q-TOF 质谱仪、离子阱质谱仪中,通常观察到的是 b、y 离子系列,a 离子、x 离子有时也会占主导地位,c 离子、z 离子则不常出现。这是因为这些类型的裂解需要的能量多于产生 b 离子、y 离子时所需要的能量。

3. 通过 MS/MS 进行肽序列分析的基本原理

在目前的 MS/MS 分析中,主要是根据完整或互补的 y、b 离子系列来确定肽的序列。还是以图 11.17 的示例来加以说明。

如果肽离子[SPAFDSIMAETLF]$^{2+}$能够按照图中所示的情况全部发生解离,则在质谱图中会出现一系列按 m/z 由小到大的质谱峰。若[SPAFDSIMAETLF]$^{2+}$是提取出来的一种母离子,则所产生的就是一张 MS/MS 谱图,是进行序列分析的基础。

从上述质谱中的 y 离子系列来看,例如,y_{12} 和 y_{11} 离子之间 m/z 的差为 97.2,相当于一个脯氨酸残基的质量;在 y_{11} 和 y_{10} 离子之间 m/z 的差为 71.0,相当于一个丙氨酸残基的质量;在 y_{10} 和 y_9 离子之间 m/z 的差为 147.20,相当于一个苯丙氨酸残基的质量。因此,从 y_{12}、y_{11}、y_{10} 和 y_9 离子之间 m/z 的差,就可以推知它们的序列为 —PAF—。如果所有的 y 离子碎片峰都在谱图中出现,则可以推测出肽的完整序列。

b 离子系列与 y 离子系列互补,例如,b_{12} 和 b_{11} 离子之间 m/z 的差为 113.1,相

当于一个亮氨酸(或异亮氨酸)残基的质量;在 b_{11} 和 b_{10} 离子之间 m/z 的差为 101.1,相当于一个苏氨酸残基的质量;在 b_{10} 和 b_9 离子之间 m/z 的差为 129.1,相当于一个谷氨酸残基的质量。因此,从 b_{12}、b_{11}、b_{10} 和 b_9 离子之间 m/z 的差,就可以推知它们的序列为 —ETL(I)—。如果所有的 b 离子碎片峰都在谱图中出现,则也可以推测出肽的相同的完整序列。

然而,不是所有实验中获得的谱图都有这么理想,其主要的影响因素有:

(1) 仪器灵敏度的限制。所得到的谱图可能是不完全的,难以解释的。

(2) 不同肽键产生片段的倾向性不同。例如,经胰蛋白酶解的肽的 MS/MS 谱图中,y 离子系列通常比 b 离子系列强,因为赖氨酸和精氨酸残基的碱性侧链有在肽片段 C 端保留正电荷的能力。

(3) 某些氨基酸侧链产生与肽骨架无关的特定裂解。例如,丝氨酸和苏氨酸残基很容易在其带有羟基的侧链上脱水,所产生的离子有时比含有完整丝氨酸或苏氨酸残基的碎片离子在谱图上的信号更强。

(4) 脯氨酸对肽离子裂解的弱化影响。脯氨酸分子中,侧链是成环的,且该环状结构中含有 α 碳原子和参与形成肽链的第二氨基。这种结构导致脯氨酸残基上的氮没有质子化位点,极大地阻碍了裂解。同时,当脯氨酸位于赖氨酸或精氨酸的 C 端一侧时,还会阻碍胰蛋白酶对肽的切割。

(5) 目前的生物质谱测序,氨基酸个数不能超过 20,否则难以得到正确结果。而且还不能区分同分异构氨基酸(如 Leu 和 Ile)。

尽管存在上述的种种不足,以 MS/MS 进行肽序列分析仍是目前最先进的方法。其一是因为它克服了 Edman 降解法的许多不足。而且,由于蛋白质是由 20 种氨基酸组成,一段 4 个氨基酸的肽有 20^4 种可能排列方式,亦即,一个特定序列的 4 肽出现的概率为 1/160 000,而一个特定序列的 5 肽出现的概率为 20^5 = 1/3 200 000。所以五、六个氨基酸残基的序列片段在一个蛋白质组中已具有很高的特异性,可以用来鉴定蛋白质。

4. 用 ESI-MS/MS 谱图鉴定蛋白质的策略

ESI－MS/MS 是获取多肽序列信息最有效的质谱方法,也是鉴定蛋白质最有用的方法之一。用 ESI－MS/MS 数据鉴定蛋白质的策略有 3 种:串联质谱数据直接搜寻策略、*de novo* 策略和肽序列标签策略。

1) 串联质谱数据直接搜寻策略

这一策略不需要解析出肽序列,可直接用 MS/MS 质谱数据进行数据库检索。其原理是利用母离子的 MS 信息和与之相关的子离子的 MS/MS 信息,通过搜索已知蛋白质数据库,对蛋白质模拟酶解,再对肽模拟碰撞,得到理论串联质谱,理论

串联质谱再与实验串联质谱进行比较,符合的作为结果。使 MS/MS 数据与数据库序列匹配以鉴定蛋白质的第一个算法/程序是建立在相关分析基础上的 Sequest。Sequest 算法和系统是由美国华盛顿大学的 Jone Yate 发明的,并由 Finnigan 质谱公司整合到质谱数据分析系统,已成为目前最常用的蛋白质鉴定软件之一。还可使用 Mascot 的 MS/MS Ion Serch 软件进行直接搜寻。这种策略要求有高质量的 MS/MS 谱图和完整、精确的数据库的支持,可以用于识别复杂的蛋白质混合物或者验证肽质量指纹搜索的结果,是目前最常用和最有效的方法。

该策略的缺点是工作量很大,难以实现高通量。例如,对于一个运行良好的蛋白质组学实验室而言,在一天之中可以获取 100 000 以上的质谱数据,而 Sequest 从 SWISS-PROT 数据库搜寻一个谱的结果大约需要 1 min,即使如此,要对一天内所产生的质谱数据进行全部搜寻需要两个月的时间。

2) *de Novo* 策略

这一策略通过直接解释 MS/MS 数据来识别肽序列,而不是与数据库中的序列进行比较。*de novo* 的含义是“从头开始计算”。其基本原理是:选择某一离子峰,从该离子峰开始,向高或低的 m/z 方向找寻对应的相差氨基酸残基的碎片峰,然后从被选择的离子碎片峰又开始找寻相应的下一个离子碎片峰。如此循环下去,可以得到一系列氨基酸序列,并最终给出所有的氨基酸序列组成,再通过序列数据库的 BLAST 检索鉴定蛋白质。

当数据库中没有目标序列、样品蛋白质出现未知修饰、以及出现未知的或非特异性裂解生成的肽时,搜索数据库的方法显得无能为力,就不得不使用 *de Novo* 的方法。但是,该方法的难点在于对 MS/MS 数据的预处理以及如何重新标定质谱。它要求质谱数据有较高质量,肽断裂情况良好,也需要研究人员有丰富的经验。但即使如此,对数据的处理也相当花费时间。此外,这一策略的实际解析结果并不理想,与真实序列的相符率只有 30%左右。所以目前尚未得到广泛的实际应用。

3) 肽序列标签(peptide sequence tag,PST)策略

这是一种将 *de Novo* 的思路与数据库搜寻相结合的策略。它不像 *de Novo* 策略那样进行完全测序,而只是对目标肽中的部分序列(称为肽序列标签)进行测定,再结合此段序列前后的离子质量和肽段母离子质量在数据库中进行检索。其原理如图 11.18 所示。

目前,用于 PST 检索的软件有 Mascot、PeptideSearch、Pepsea 等。Mascot 所提供的肽序列标签鉴定蛋白质的软件是 Mascot Sequence Query,其查询界面上的 Query 用于肽序列标签的输入。以图 11.18 为例,向 Query 输入的数据依次为 718.8,MAE,1050.2。

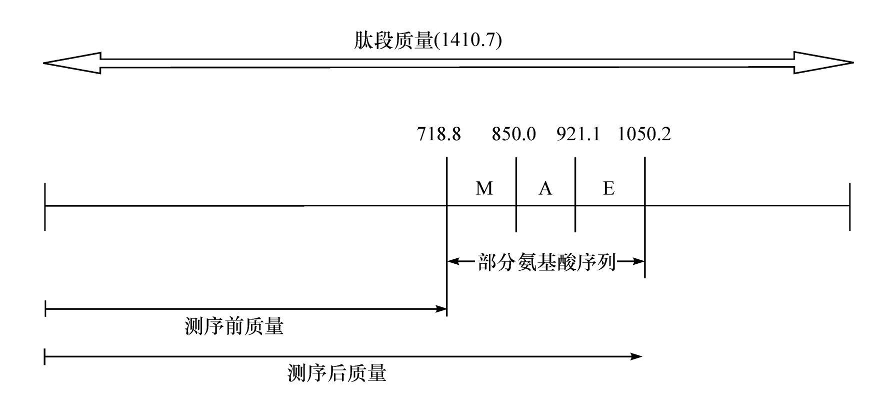


图 11.18　肽序列标签示意图

肽序列标签是由一个肽段的相对分子质量、该肽段的部分氨基酸序列、该肽段未测序前部分和测序后部分的质量组成

用 ESI-MS/MS 数据鉴定蛋白质的算法和与之关联的软件工具，将在第 13 章中做概要的介绍。

11.7　定量蛋白质组学技术

在蛋白质组学研究中，监控蛋白质的表达水平对研究细胞内或体内存在的各种生物进程是非常重要的，因此，定量蛋白质组学(quantitative proteomics)技术日益受到重视。通常情况下，人们是对两种不同状态的同一种样品的蛋白质差异表达进行比较，因此，对蛋白质的定量不必是检测其在样品内表达的绝对含量，而是只需对相对含量的变化进行准确的定量即可。

11.7.1　定量蛋白质组学技术的分类

当前，蛋白质组研究中的定量策略和方法有两类：

(1) 利用荧光染料进行定量的技术，如 2-D DIGE，见 11.4.5.3 节。

(2) 以质谱检测技术为基础的化学标记定量方法。其基本做法是对来自不同状态的同一种样品的肽段标上一个内部标准(internal standard)，使得可以识别不同来源的肽段，同时标记好的肽段的化学性质基本上是一样的，这样就可以确保同一次质谱扫描中两者的离子化效果是相同的。此时，肽质谱峰信号成对出现，质谱峰的信号强度就可以作为定量的依据。

这种定量方法又分为体内标记技术、体外标记技术两类。体内标记技术是使细胞在含有稳定同位素的介质中生长，稳定同位素被结合进蛋白质，从而充当了蛋白质定量的内部标准。曾经使用过的方法有 ^{15}N 体内代谢标记、稳定同位素标记

的必需氨基酸体内标记(SILAC 法)等。体内标记技术的优点是省去了标记化学反应和分离纯化等步骤,因而减少了样品的损失,有利于低丰度蛋白的高灵敏度检测。但是,这类技术有其明显的缺点,如:不能对组织来源的蛋白质进行分析;不能培养细胞在富含稳定同位素的介质中生长,这些介质可能会对细胞的繁殖和其他生物进程产生影响,由此改变蛋白质的表达水平;由于受到同位素材料成本的限制,不可能对整个动物体进行标记;对于未知序列肽段,大多数的体内标记都无法确定标记物与肽段之间的量的关系等。因此,在蛋白质组学分析中,体内标记技术的应用范围并不广泛。

近年来,定量蛋白质组学的发展主要集中在体外标记技术方面。这些技术消除了体内标记定量带来的缺陷,使样品来源不再局限于培养的细胞。根据所标记的氨基酸残基位点的不同,体外标记技术分为氨基(—NH_2)标记、羧基(—COOH)标记、巯基(—SH)标记等。巯基(—SH)标记,即同位素标记和标签(isotope-coded affinity tag, ICAT)策略是在目前定量蛋白质组学的研究中应用最为广泛的。

11.7.2 ICAT 策略与基本操作过程

ICAT 策略由 Gygi 等[36]于 1999 年提出,这种定量策略建立在一种新型的化学反应试剂——ICAT 试剂使用的基础上。

1. ICAT 试剂

ICAT 化学试剂的结构由 3 部分组成:①反应基团(碘乙酰胺基),用来特异结合半胱氨酸残基上的巯基,使试剂共价结合在蛋白质侧链上;②同位素标记的接头,或者含有 8 个氢原子(非标记的,d_0),或者含有 8 个氘原子(非标记的,d_8);③亲和标签(生物素,biotin),用来分离经 ICAT 标记后的多肽。因此,ICAT 化学试剂有两种成分,即:d_0-ICAT 化学试剂(称为轻试剂)和 d_8-ICAT 化学试剂(称为重试剂)(图 11.19)。

2. ICAT 标记方法的步骤

当分别用两种试剂去标记不同状态下的同一蛋白质时,不同标记的蛋白质之间的分子质量就相差 8 Da,体现在质谱图上就是这对标记蛋白质的肽段离子峰质荷比(m/z)相差为 8 或 4(当为双电荷肽段离子时),从而能将来自不同样品的同一蛋白质分离开。其基本的操作步骤为(图 11.20):

(1) 将来自一种状态下的细胞的蛋白质混合物还原后用 d_0 试剂标记蛋白质侧链上的 Cys 残基;将来自另一种状态下的同种细胞的蛋白质混合物还原后用 d_8 试剂标记。

(2) 混合两种状态下的样品,经 SCX/RP-HPLC 二维色谱分离,除去消化酶、

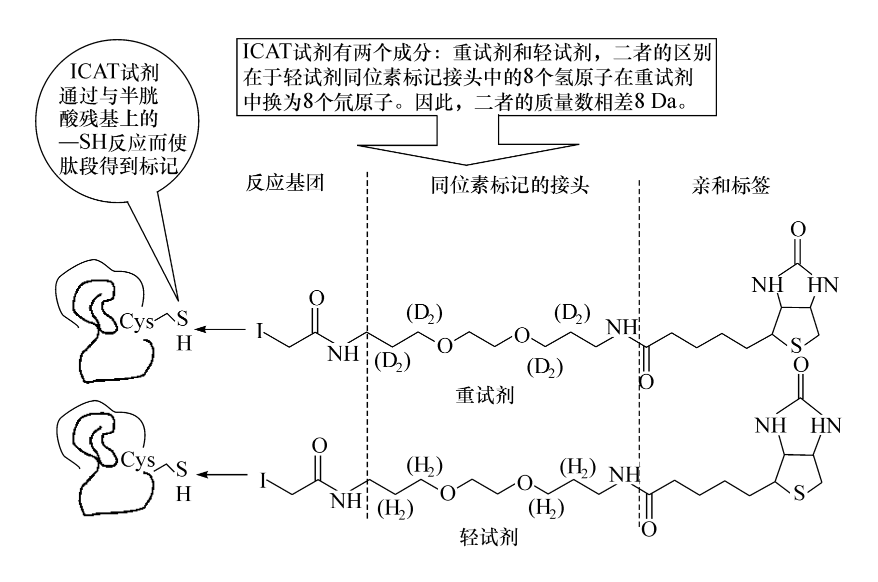


图 11.19　ICAT 试剂

图 11.20　定量蛋白质组学分析的 ICAT 策略

去垢剂、还原剂和 ICAT 试剂。

(3) 用胰蛋白酶酶切,产生多肽片段,包括标记过的和没有标记的。

(4) 混合物过抗生物素亲和色谱柱分离,得到只含有同位素标记的多肽混合物。

(5) 将分离得到的标记多肽混合物再用 RP-LC/nano ESI-MS/MS 分离和鉴定。

在比较蛋白质组学研究中,ICAT 策略有 2-DE 和 MALDI-TOF 方法不具备的一些优点。如:①在蛋白质含有的氨基酸残基中,没有哪一个能比半胱氨酸(Cys)残基上的巯基(—SH)更具有标记反应的特异性。若一种蛋白质酶切产生至少有一个 Cys 残基的肽段,就可以对其鉴别和定量。含有 Cys 残基的肽段越多,结果对照得出的结论越准确。②由于鉴定的肽段中肯定都含有至少一个 Cys 残基,因此,在进行数据库搜索时就增加了一个有效的约束条件。③肽段根据标记情况有选择性地得到了富集,从而减少了下游质谱分析的复杂程度。④分离出来的标记多肽可直接与后面的 RP-LC/MS 系统在线偶联操作。

ICAT 策略的缺陷是:①没有 Cys 残基的蛋白质得不到鉴定;②被 d_0 和 d_8 修饰后的肽不能被反相色谱联合洗脱,使定量准确度降低;③标签本身体积很大,因此在 MS/MS 谱图中,修饰后肽的裂解会产生众多与标签相关的离子碎片,这些碎片有时甚至多于与肽相关的离子碎片;④由附加的标签产生的实际质量增加,能将较大肽的质量转移至标准质谱仪的最佳检测范围之外;⑤最后,对重 ICAT 试剂质量差异 8 Da 的选择,会在含有两个被 ICAT 标记的半胱氨酸残基($\triangle M$+16.100 Da)的肽和甲硫氨酸残基($\triangle M$+15.995Da)普通氧化物之间产生难以辨认的质谱峰。

11.7.3　cICAT 标记技术[37~39]

cICAT 标记技术与 ICAT 标记技术在策略上是一样的,但是用 cICAT 试剂取代了 ICAT 试剂。cICAT 试剂称为可裂解的 ICAT 试剂(cleavable ICAT reagent)。

cICAT 试剂也有轻试剂和重试剂两种成分。轻试剂的组成为 $C_{43}H_{70}N_7O_{12}SI$,重试剂的组成为$^{13}C_9C_{34}H_{70}N_7O_{12}SI$(其中含有 9 个$^{13}C$)。因此,这两种结构相同的化合物的分子质量相差 9Da(图 11.21)。

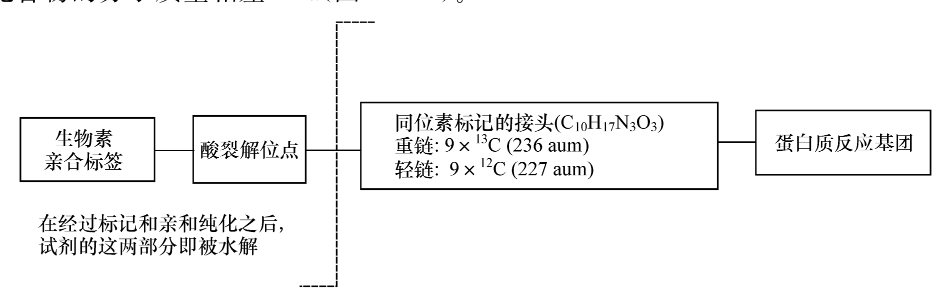


图 11.21　cICAT 试剂

它们均包含 4 个部分:①蛋白质反应基团[protein reactive group(iodoacetamide)],可特异地与蛋白质肽链上的 Cys 残基的巯基(—SH)进行反应,使试剂共价结合在蛋白质侧链上;②同位素标记的接头[isotope-coded tag($C_{10}H_{17}N_3O_3$)],含有稳定同位素(^{12}C 或 ^{13}C)的标记;③可被三氟乙酸裂解的位点(acid cleavable linker);④生物素亲和标签[affinity tag(biotin)],用于亲和分离标记的蛋白质或多肽。

与用稳定同位素(^{1}H 或 ^{2}H)标记的 ICAT 试剂相比,cICAT 试剂的优点为:在经过标记和亲和纯化之后,图 11.21 中的 affinity tag(biotin)和 acid cleavable linker 两个部分可被水解掉,增加了两种被标记蛋白的疏水性差别,有利于色谱分离;减小了亲和标签在标记蛋白质中所占的质量比,有利于质谱分析,也降低了数据库搜索的复杂性;排除了氧化态甲硫氨酸和双巯基标记肽的干扰;充分地降低了副反应的发生;质谱图变得更为“干净”,有利于用 LC-MS/MS 对肽段结构的解析。

11.8　表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术

表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-fight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)是在 MALDI-TOF-MS 基础上发展起来的一种有效的比较蛋白质组学研究技术。这一技术最早由德国科学家 Lueking 等[41]开始研究,由美国赛弗吉公司(Ciphergen Biosystem Inc.)进行了系统研发,对 MALDI-TOF-MS 技术所使用的疏水性样品板表面进行了系统的改进,发展成为蛋白质芯片(proteinchip array)系列。

11.8.1　蛋白质芯片的种类与特点

蛋白质芯片包括两个基本组成部分:①特殊材料制成的固相载体,呈薄片型、长条状。常用的芯片制作材料有金属、硅、云母、各种膜片等。②在固相载体表面以特定方式固定的具有特定功能的表面功能基团与固相载体共同形成芯片池,一条长 77 mm、宽 9 mm 的芯片上有 1 mm×1 mm 大小的芯片池 8 或 16 个。

SELDI-TOF-MS 所使用的蛋白质芯片根据表面功能基团性质的不同,分为化学表面芯片(chemical surface—— protein expression profiling)和生物表面芯片(biochemical surface——protein interaction assay)两大类[41]。

1. 化学表面芯片

化学表面芯片是基于色谱(反相色谱、离子交换色谱、金属螯合色谱、正相色谱等)的原理设计的,即将色谱介质铺于芯片材料表面,形成一个特殊的物理化学表

面，通过色谱介质与目标蛋白的相互作用（如疏水作用、离子交换作用、螯合作用、静电作用、偶极-偶极相互作用及氢键力等）结合样品中的蛋白质，再经洗脱液去除非特异结合蛋白质和其他杂质，最后用 SELDI-TOF-MS 分析保留在芯片上的目标蛋白，获得有关信息。

目前商品化的化学表面芯片有 5 种：

（1）疏水芯片（hydrophobic proteinchip array）。表面有不同长度的烷基链，通过疏水（疏溶剂）相互作用结合蛋白质分子中的疏水基团，用于捕获疏水蛋白、膜蛋白、脂蛋白等。

（2）弱阳离子交换芯片（weak cationic exchanger）。表面有羧基衍生的阴离子交换基团，通过静电相互作用结合蛋白质分子中带正电荷的氨基酸残基，用于捕获带正电荷的蛋白质。

（3）强阴离子交换芯片（strong anionic exchanger）。表面有铵基衍生的阴离子交换基团，通过静电相互作用结合蛋白质分子中带负电荷的氨基酸残基，用于捕获带负电荷的蛋白质。

（4）金属离子捕获芯片（immobilized metal affinity capture，IMAC）。表面经氮基三乙酸（nitrilotriacetic acid，NTA）修饰，通过 NTA 所螯合的正二价或正三价金属离子，与蛋白质分子中能与其形成配位体的氨基酸残基结合，捕获相应的蛋白质分子。其中，由于许多信号蛋白能与 Ni、Cu 等结合，而磷酸化蛋白能与 Ga 结合，因此，IMAC-Ni 芯片、IMAC-Cu 芯片、IMAC-Ga 芯片可用于细胞信号转导研究。此外，IMAC-Cu 芯片对于金属硫蛋白的分离纯化及组成研究具有优势。

（5）正相亲水芯片（normal phase proteinchip）。表面为 SiO_2，通过静电作用、偶极-偶极相互作用及氢键结合蛋白质分子中的亲水基团和极性基团，用于对纯化蛋白或标准品的检测。

2. 生物化学表面芯片

生物化学表面芯片是基于生物分子相互作用的原理设计的，用于进行蛋白质-蛋白质、DNA 或 RNA-蛋白质、药物-蛋白质相互作用研究。这类芯片是将蛋白质、多肽等具有生物活性的分子（如抗原、抗体、配体、酶等）固定于芯片表面，通过生物亲和作用，特异性地捕获样品中的目标蛋白，再经洗脱液去除非特异结合蛋白质和其他杂质，最后用 SELDI-TOF-MS 分析保留在芯片上的蛋白质，获得有关的信息。为了使生物活性分子能有效地结合于芯片表面，先以羰基二咪唑（carbonyldiimidazole）或环氧化合物（epoxide）对表面预活化，生物活性分子中的胺基再通过亲和作用在预活化的表面上与之形成牢固的共价结合。与芯片表面共价结合的生物活性分子被称为诱饵蛋白质或诱饵化合物。

表 11.11 列出了美国赛弗吉公司所开发的两类芯片的商品型号与基本特点。

表 11.11 SELDI-TOF-MS 技术中使用的蛋白质芯片[42]

类型	蛋白质芯片名称	蛋白质芯片表面的性质	相互作用的性质	与蛋白质作用的位点	键合条件	洗脱条件
化学表面芯片(用于蛋白质表达与差异表达的剖析)	(1) 疏水性蛋白质芯片阵列(hydrophobicproteinchip array)	H50:C6-12 H4:C16	疏水作用;疏溶剂作用	丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸残基	高盐(HIC);低有机成分的水溶液(RP)	HIC:减小盐的浓度;RP:增加有机相的浓度
	(2) 弱阳离子交换蛋白质芯片(protein chip WCX2 and CM10)	以羧基衍生的阴离子表面	离子交换作用	赖氨酸、组氨酸、精氨酸残基	低 pH ($pH<pI-1$);低盐	增加盐的浓度;增加 pH
	(3) 强阴离子交换蛋白质芯片(proteinchip SAX2 and Q10)	以铵基衍生的阴离子表面	离子交换作用	天冬氨酸、谷氨酸残基	高 pH ($pH>pI+1$);低盐	增加盐的浓度;降低 pH
	(4) 固定化金属亲合捕获蛋白质芯片(immobilized metal affinity capture protein chip array IMAC3 and IMAC30)	键合氮基三乙酸(nitrilotriacetic acid, NTA)分子的表面	通过螯合金属离子(如+2 价的 Zn, Co, Ni, Cu, Ca, Mg; +3 价的 Al, Fe, Ga)捕获蛋白质分子	组氨酸、半胱氨酸、色氨酸残基,磷酸化蛋白质	高盐;pH 6~8	增加咪唑;增加甘氨酸;增加磷酸盐(在捕获磷酸化蛋白质时)
	(5) 正相蛋白质芯片(normal phase proteinchip: NP20 proteinchip array)	正相亲水性 SiO_2 表面	静电作用,偶极-偶极相互作用,氢键	丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸残基	缓冲溶液	水洗脱
生物化学表面芯片(用于蛋白质相互作用研究)	(1) PS-100 蛋白质芯片(PS-100 proteinchip array)	羰基二咪唑(carbonyldiimidazole)共价结合于伯胺基而形成预活化表面	由与芯片表面共价结合的诱饵蛋白质或诱饵化合物的性质所决定	诱饵蛋白质或诱饵化合物与抗体、酶、DNA、受体或药物发生亲合作用的位点	根据具体的特异反应选择键合条件	根据具体的特异反应选择洗脱条件
	(2) PS-20 蛋白质芯片(PS-20 proteinchip array)	环氧化合物(epoxide)共价结合于伯胺基而形成预活化表面	同上	同上	同上	同上
	(3) PS-10 蛋白质芯片(PS-10 proteinchip array)	羰基二咪唑(carbonyldiimidazole)共价结合于伯胺基而形成预活化表面	同上	同上	同上	同上

生物化学表面芯片的灵敏度极高，可以定量检测 fmol 级的蛋白质，线性关系可达到 R=0.995。由于采用飞行时间质谱为芯片的检测手段，因此可以区分与同一抗原决定簇相结合的不同相对分子质量的蛋白质。

在大规模的比较蛋白质组学研究中，SELDI-TOF-MS 策略有其技术上的优势。例如，在从体液样品发现生物标志的研究中，可以同时使用 3 种芯片：以 CM10 获取样品中的碱性蛋白质、以 H50 获取样品中的疏水性蛋白质、以 IMAC30 获取样品中的含金属蛋白质，这样就可以得到更多的信息。

11.8.2 SELDI-TOF-MS 的基本技术路线

如表 11.11 所示，不同的化学表面芯片和生物化学表面芯片与蛋白质有不同的结合位点，所以对蛋白质样品能起到选择性捕获和特异性富集的作用。样品加入芯片池后，能与芯片表面功能基团相结合的蛋白质将被保留在芯片上，而不能与芯片表面功能基团相结合的蛋白质将被缓冲液洗掉。保留在芯片上的蛋白质分子以能量吸收分子覆盖，经干燥后，以脉冲激光照射，蛋白质分子发生离子化并进行质谱分析。SELDI-TOF-MS 的基本技术路线包括以下几个实验步骤：

（1）以生物样品处理芯片。SELDI-TOF-MS 的芯片可直接用于尿液、血液（血清、血浆）、脑脊液、关节腔滑液、支气管洗脱液、穿刺液、细胞裂解液和各种分泌物等粗生物样品中目标蛋白的捕获、富集和检测。

对于化学表面芯片，将样品稀释或直接点加在芯片上。

对于生物化学表面芯片，在加样品之前，要先加入诱饵蛋白质或诱饵化合物（如抗体等）预先进行反应，未被抗体结合的部位需用乙醇胺（ethanolamine）或三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane，Tris]封闭，以减少非特异性结合，然后再加入样品。

（2）以水清洗蛋白质芯片，除去非特异性结合的蛋白质和缓冲液。

（3）加能量吸收分子（energy adsorb molecular，EAM）。与 MALDI-TOF-MS 分析类似，在进行 SELDI-TOF-MS 分析时，由于蛋白质本身不吸收能量，因此，在蛋白质与芯片结合后，必须加入能够吸收激光能量的介质即能量吸收分子（或称基质），以促使蛋白质分子发生离子化。SELDI-TOF-MS 分析中使用的 EAM 有三种：①α-氰基-4-羟基肉桂酸（α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid，CHCA），用于分子质量小于 15 kDa 的蛋白质分子的离子化；②3，5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸（sinapinic acid，SPA），用于分子质量大于 10 kDa 的蛋白质分子的离子化；③EAM-1，用于分子质量 10～40 kDa 的蛋白质分子以及糖蛋白的离子化。

（4）质谱分析。SELDI 芯池被分为 100 个格点，用 337 nm 氮激光脉冲阅读芯片，每点阅读 20 次，总共阅读 2000 次。每产生一个样品的质谱图，要采集范围在较中心的 20～80 格点间的约 100 次脉冲阅读结果的累计平均值，以确保良好的重复性。

对同一个样品的测定，用低能量与高能量两种激光脉冲。低能量组一般设最高分子质量为 50 000 Da，最佳范围 3000～15 000 Da；高能量组一般设最高分子质量为 200 000 Da，最佳范围 10 000～50 000 Da。

（5）数据处理与分析。目前，SELDI-TOF-MS 所得到的数据主要是不同状态下的蛋白质组的精确相对分子质量，因此，数据处理与分析的功能着重于对这些精确相对分子质量数据的比较和分析，从中归纳出差异区并进行统计学处理。由 CIPHERGEN 开发的 Biomarker Patterns Software（BPS）软件是 SELDI-TOF-MS 目前所使用的主要软件，该软件基于生物统计学分类与回归树（classification and regression tree，CART）算法，所显示的结果见图 11.22。

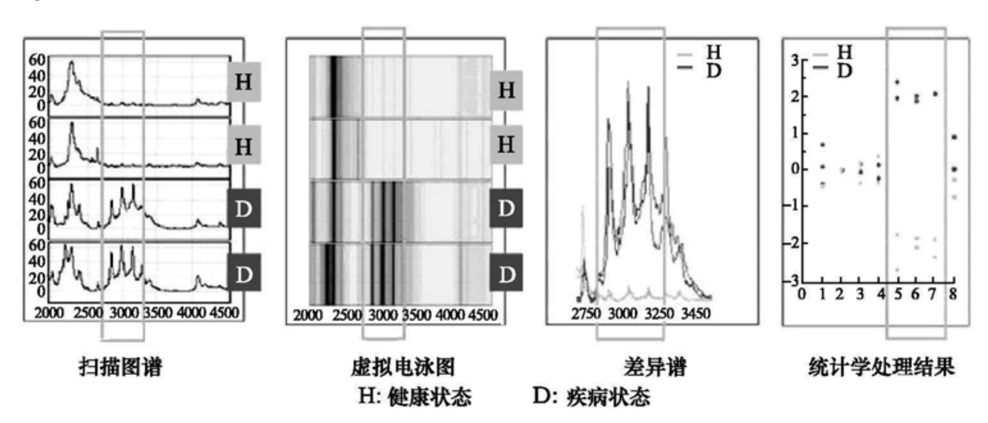


图 11.22　SELDI-TOF-MS 数据处理与分析的结果

11.8.3　SELDI-TOF-MS 的应用

以蛋白质芯片为核心技术的 SELDI-TOF-MS 分析结合了质谱、色谱等技术原理，能对血清、尿液等原始样品进行大规模检测。SEIDI-TOF-MS 技术有以下优势：①集蛋白质样品的前处理、分离及检测分析过程于一体，可对血清及组织粗样品中的各种蛋白质进行直接检测；②可检测的分子质量范围广，适合于分析分子质量 20 kDa 以下的蛋白质；③携带的分析软件可以迅速发现各种疾病特异性变化的差异蛋白质群，用于发现与疾病相关的一种或一组生物标记物；④重复性好、操作简便、所需样品量少。因此，SELDI-TOF-MS 在临床蛋白质组学中是一种具有实用性的技术平台，将在临床疾病的早期诊断和风险评估、药物筛选、个性化药物的研发和应用领域起到重要的作用。尤其是在筛选肿瘤标志物中，用该技术将患者与正常人或其他某种疾病患者的图谱进行比较分析，有助于发现新的、特异性的肿瘤相关蛋白。SELDI-TOF-MS 目前报道用该技术已经发现了膀胱癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、胰腺癌以及肾脏肿瘤等多种肿瘤的新的肿瘤特异性

标志分子[43,44]。

SELDI-TOF-MS 还存在一些问题,如目标蛋白的纯化、试验的标准化和数据报告的规范化、大量数据的处理和分析软件的开发、高度集成化样品的制备及检测仪器的研制和开发、检测灵敏度的提高等。目前,各芯片技术开发商正针对上述问题加强相关技术研发。美国国家癌症研究所通过创立早期检测研究网络(early detection research network,EDRN),将学术界和生产部门的专家联合起来,以加速生物标记物的研究和论证,旨在为加快已发现的蛋白质标记物转化为临床早期诊断工具和风险评估提供新的公共平台[45]。

11.9 表面等离子共振技术

表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)技术是一项用于分析生物大分子之间的相互作用的技术。它可以定性的判断两分子之间是否有相互作用、比较一种分子与其他几种分子之间相互作用的强弱、也可以实时定量的测定分子间相互作用的亲和力参数(平衡常数)和动力学参数(速率常数)甚至热力学参数(反应的焓)。该技术利用了物理光学的原理,在研究两分子相互作用时,将一种分子固定在传感片表面,而使另一种分子的溶液流过其表面,两种分子的结合会使传感片表面的折射率改变,因此检测到两分子间的相互作用程度。该技术目前已广泛应用于免疫学、蛋白质组学、药物筛选、蛋白质与核酸相互作用等各个领域,并获得了许多用其他方法无法得到的动力学数据。

与其他一些检测生物分子相互作用的技术,比如酶联免疫标记(ELISA)、平衡透析(equilibrium dialysis)、亲和层析(affinity chromatography)等技术相比较,SPR 蛋白质组学研究中的优势有:①可实时监测生物分子的相互作用;②不需要作标记;③快速,一次分析只需几分钟;④可回收并纯化与受体结合的配体进行质谱鉴定。

11.9.1 SPR 的基本原理

当光波从折射率大的光密介质射向折射率小的光疏介质,比如由玻璃射向空气,且入射角大于临界角时,没有折射光产生,入射光全部反射回去,这一现象称为全反射。全反射时,光波将透入光疏介质很薄的一层表面(深度约为光波波长),并沿界面流动约半个波长返回光密介质。透入光疏介质的光波称为倏逝波(evanescent wave)。

若在两介质的界面镀上一层很薄的金属薄膜且薄膜厚度在倏逝波进入光疏介质深度之内,则当一束单频线偏振光以大于全反射临界角的某一角度入射、且其频率与金属表面振荡的自由电子(即等离子)频率一致时,金属表面的等离子就会吸收入射光的能量发生共振,这一现象称为表面等离子共振,此时的入射角称为共振

角。发生表面等离子共振时,光波以倏逝波的形式将能量转移成表面等离子共振波。这时,反射光的强度和相位均发生剧烈变化,入射光能量被吸收,反射光能量降低,出现一吸收峰。

根据这一原理研制了 SPR 传感器,其工作原理如图 11.23 所示[46]。在检测时,共振角的变化就反映了结合在传感片表面的物质质量的变化。因此通过分析共振角,就可以分析分子之间的相互作用。在 SPR 中,共振角的单位规定为 RU,即反应单位或共振单位,1 RU$=10^{-4}$度。测量的经验显示,当有 1 ng · mm^{-2}的蛋白质连接到表面时,约导致共振角增大 1000 RU。

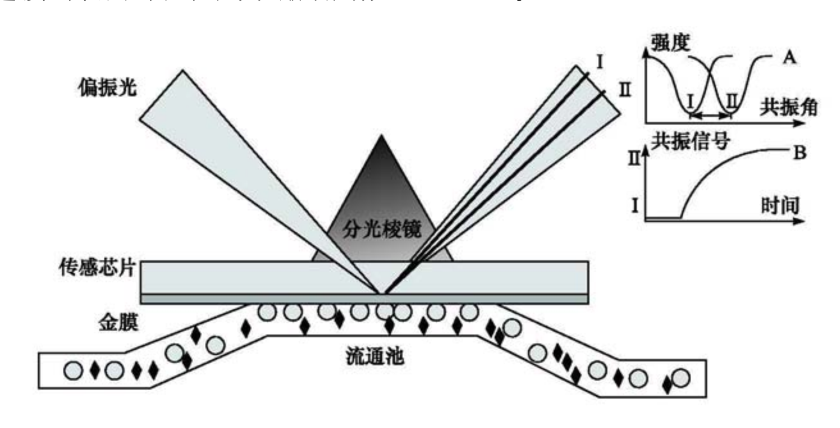


图 11.23　SPR 的典型响应模式

入射的偏振光照射到玻璃与空气的界面,发生全反射,并产生倏势波。玻璃表面镀了一层很薄的金,由于入射光与金膜的表面等离子(振荡的表面自由电子)的频率相匹配,因此发生共振,入射光能量被吸收,反射光能量降低,出现一吸收峰。共振角大小随传感片表面的分子质量改变而从 Ⅰ 移到 Ⅱ(图中 A)。被分析物——“配体”溶液流过固定有‘受体’的传感片表面,若发生作用而相互结合则会引起表面物质质量改变,而折射率与质量成正比,所以折射率改变。欲保证 SPR 发生,共振角也得随折射率改变,改变大小与结合的“配体”质量成正比。随时间延长,结合在表面的“配体”-“受体”复合物增多,共振角也随之增大。因此,可以绘制出响应(RU)-时间曲线(图中 B)

11.9.2　一次典型的 SPR 分析过程

在 SPR 分析中,是通过响应(RU)-时间曲线来分析生物大分子的相互作用情况的。相互作用的两种分子中,一种作为“受体” 固定在传感片的表面;另一种作为“配体”溶解在溶液中,通过微流通道流过固定有“受体”的传感片表面。若二者发生作用,则会引起表面物质质量改变,从而导致折射率改变。因此,典型的响应(RU)-时间曲线包括 3 个部分:①结合相(association),在这个时间段内,曲线反映出随着“配体”-“受体”结合浓度的增加,响应(RU)也随之增大,最终达到稳态(steady state);②解离相(dissociation),在这个时间段内,曲线反映出“配体”-“受体”的解离情况。结合区和解离区的变化规律反映出“配体”-“受体”结合的动力学

情况；③再生区(regeneration)，反映出“配体”通过传感片表面后，缓冲溶液流过微流通道使传感片再生的情况。

其典型的 SPR 分析过程包括以下基本步骤(图 11.24)：

(1)“受体”固定在传感片表面(经适当的化合物修饰的金薄膜表面)，在 0s 时，缓冲液流入微流小室与传感片接触。

(2) 在 100s 时，“配体”溶液流入，与“受体”结合，传感片表面分子质量增加，使介质折射率升高，导致共振角增加。反应达到平衡时，结合与解离速率相等。共振角改变的程度与“配体”的浓度正相关，若制备几组已知浓度的“配体”，进行该分析过程，则可计算得到平衡常数(K_a)。

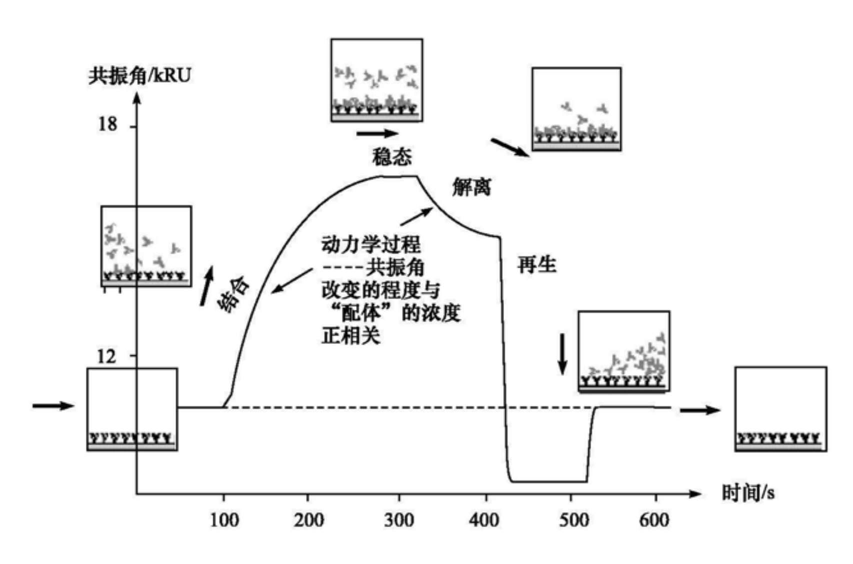


图 11.24　SPR 传感器的一次典型的分析过程

(3) 在 320s 时，停止注入“配体”，通入缓冲液，“配体”-“受体”解离。分析两相(连接相、解离相)数据，可以得到结合速率常数(K_{on})和解离速率常数(K_{off})。平衡常数也可以由速率常数计算得到($K_a = K_{off} / K_{on}$)。

(4) 在 410s 时，加入 NaOH 溶液洗去“表面分子”，使得传感片再生，然后再注入“配体”，进行新的一轮分析。

11.9.3　BIACORE 系统[47]

BIACORE 是基于 SPR 分析的商品化的仪器系统，BIA 是生物分子相互作用分析(biomolecular interaction analysis)的缩写。BIACORE 已有多种型号，但均由传感器芯片、SPR 光学检测系统、微射流卡盘 3 个核心部分组成。

1. 传感器芯片

传感器芯片(sensor chip)是实时信号传导的载体。芯片是在玻璃片上覆盖了一层金膜,在金膜的表面连有不同的多聚物以形成不同的表面环境以利于捕获不同性质的生物分子。每个芯片表面有 4 个通道(FC),可以独立做 4 个不同的实验,也可以做实时的对照实验。

目前,已至少有 5 种商业化的传感片可用于不同的分析目的:

(1) 传感器芯片 CM5。传感片表面被覆了一层羧甲基葡聚糖基质,是最常用的一种传感片。对于带有—NH_2、—SH、—CHO、—OH、—COOH 的生物分子(配体),可通过化学反应,以共价偶连的方式与葡聚糖基质上的羧基偶连。

(2)传感器芯片 SA。传感片表面被覆了一层链酶抗生物素(streptavidin),能与生物素标记的肽、蛋白质和 DNA(配体)结合。用于 DNA-DNA、RNA-DNA、RNA-蛋白质相互作用的研究。

(3) 传感器芯片 NTA。传感片表面被覆了一层氮基三乙酸(nitrilotriacetic acid,NTA),通过镍-组氨酸离子螯合作用与其反应,可将带有末端组氨酸修饰的生物分子(配体)连接到传感片表面。这种传感片能保持生物分子的空间结构。

(4) 传感器芯片 HPA。传感片提供了一种疏水表面,研究者可在其上铺一层脂质体,而要研究的受体就嵌在磷酸分子层中。因此,这种传感片适合于研究细胞膜受体在膜环境中与配体的相互作用。

(5) 传感器芯片 L1。表面由亲脂的葡聚糖化合物组成,能直接插入磷脂双分子层将脂质体或细胞捕获到传感片,用于研究膜信号传导。

2. SPR 光学检测系统

如前所述,当入射光以临界角入射到两种不同透明介质的界面时将产生全反射,且反射光强度在各个角度上都应相同,但若在介质表面镀上一层金属薄膜后,由于入射光可引起金属中自由电子的共振,从而导致反射光在一定角度内大大减弱。其中使反射光完全消失的角度称作共振角。共振角会随金属薄膜表面通过的液相的折射率的改变而改变,折射率的变化(RU)又与结合在金属表面的生物大分子的质量成正比(1000 RU 的变化表示传感片表面 1 $ng \cdot mm^{-2}$ 的质量变化)。因此,光学检测系统可以通过对反应全过程中各种分子反射光的吸收获得初始数据,并经相关处理获得结果。SPR 检测器所获得的信息可直接来自表面的样品,也可间接来自能与样品特异结合的相关试剂,还可以从粗样品的嘈杂信号中获得微量待测样品的特异性信号。

3. 微射流卡盘

微射流卡盘是一个液体传送系统，通过软件的控制自动地传送一定体积的样品至传感器芯片表面。它可以通过对管道内微型气阀的控制，形成各种液体流动回路，将样品或缓冲液送到传感片表面的不同通道，还可以自动进行样品的回收。

11.9.4 SPR 技术在蛋白质组学分析中的应用

在 SPR 的实时监测中可以获悉：①生物分子发生相互作用的特异性；②分子的结合浓度；③相互作用的速率、结合和解离的比例；④相互作用的程度；⑤是否存在异构效应；⑥相互作用模式等。因此，SPR 技术的应用领域是相当广泛的。在蛋白质组学分析中，目前的主要应用有：

1）生物分子相互作用分析——质谱联用技术(SPR/MS)

这是 SPR 技术与 MALDI-TOF-MS 结合形成的一种新的研究手段。在蛋白质功能的研究中，利用 SPR 传感片作为亲和表面，分离和收集足够量的蛋白质，在经酶消化后，用 MS 鉴定蛋白质。通过一次连续的实验，就可以获得动力学参数、平衡常数、蛋白质结构等丰富的信息。SPR/MS 在选择性回收靶蛋白中具有特异性和极高的敏感性，并能有效区别靶物质和非靶物质。这一技术在研究蛋白质复合物组分间相互作用的动力学参数、利用结合位点的结构研究筛选功能性的突变、通过依次结合事件的分析揭示重要的生理分子级联反应机制、研究任何蛋白质间的相互作用等方面具有广泛的用途。

2）蛋白结构与功能关系的分析

SPR 在实时检测分子间相互作用时可提供动力学信息。由同一蛋白质中不同氨基酸残基与其他分子相互作用时的动力学改变不同，可推测出该蛋白质内部存在的不同功能基团、蛋白质在翻译后发生的不同修饰。例如，将脂蛋白 B100 固定于传感片上，依次注入不同的单克隆抗体，由于不同的抗体与脂蛋白 B100 相互作用的能力不同，所以可以精确鉴定脂蛋白 B100 上的不同结构域。

3）生物特异相互作用的动力学、结合位点及浓度分析

生物分子作为分析物可与传感芯片上固相化的特定的配位体进行生物特异性相互作用，例如传感片 SA 结合生物素化的配位体可与肽类、蛋白质类及 DNA 等分析物结合；传感器芯片 NTA 通过金属络合捕获配位体可与组氨酸标记蛋白质类分析物结合；传感器芯片 HPA 的疏水性表面涂以规定使用的脂质体类，造成亲水性表面与分析物结合。

4）免疫特异识别机制的研究

T 细胞对抗原的识别是目前免疫学研究的热点。T 细胞受体（T cell receptor，TCR）只能识别表达于抗原呈递细胞表面的由主要组织相容性复合物肌球蛋白重链（myosin heavy chain，MHC）分子呈递的抗原肽段。而应用 SPR 可以定性、定量地研究 TCR 和 MHC 分子/抗原肽段之间相互识别的特异性和相互作用的强弱及动态常数。

5）配体垂钓（ligand fishing）

SPR 具有在非纯化条件下测定生物分子之间相互作用的能力，因此对在细胞粗提液和细胞上清液中筛选和确定一些孤儿受体（orphanreceptor）的未知配体而言是一种较为理想的技术。

参考文献

[1] Marte B. *Nature*. 2003，**422**：191

[2] Tyers M. *Nature*. 2003，**422**：193

[3] Peng J M ，Gygi S P. *J. Mass. Spectrom*. 2001，**36**：1083

[4] Fu YR，Yan YR，Qui ZY. *Mitochondrion*. 2006，6：211

[5]（美）Erica Golemis . 蛋白质-蛋白质相互作用. 贺福初，钱小红，张学敏等译. 北京：中国农业出版社，2004. 1

[6] Tonge R，Shaw J，Middleton B et al. *Proteomics*. 2001，**1**：377

[7] Hoving S，Voshol H，Oostrum J. *Electrophoresis*. 2000，**21**：2617

[8] Gygi S P，Rochon Y，Franza B R et al. *Mol. Cell. Biol*. 1999，**19**：1720

[9] Wolters D A，Washburn M P，Yates J R. *Anal. Chem*. 2001，**73**：5683

[10] Washburn M P，Ulaszek R，Deciu C et al. *Anal. Chem*. 2002，**74**：1650

[11] Issaq H J，Veenstra T D，Conrads T P et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002，**292**：587

[12] Han D K，Eng J，Zhou H et al. *Nat. Biotechnol*. 2001，**19**：946

[13] Schneider L V，Hall MP. *Drug Discovery Today：Targets*. 2005，**10**：353

[14] Mering C V，Krause R，Snel B et al. *Nature*. 2002，**417**：399

[15] Hanash S. *Nature*. 2003，**422**：226

[16]（澳）辛普森 R J. Proteins and proteomics：A laboratory manual（影印版）. 北京：科学出版社，2003. 567

[17] McDonald W H，Yates J R. *Curr. Opin. Mol. Ther*. 2003，**5**：302

[18] 郭尧君 编著. 蛋白质电泳实验技术（第二版）. 北京：科学出版社，2005. 195

[19] BIO-RAD：2-DE ectrophoresis for Proteomics—A Methods and Product Manual

[20] Neuhoff V，Arold N，Taube D et al. *Electrophoresis*. 1988，**9**：255

[21] Yan J X，Wait R，Berkelman T et al. *Electrophoresis*. 2000，**21**：3666

[22] Steinberg T H，Agnew B J，Gee K R et al. *Proteomics*.2003，**3**：1128

[23] 摘自 ExPASy：SWISS-2DPAGE Map Selection

[24]（澳）辛普森 R J. Proteins and proteomics：A laboratory manual（影印版）. 北京：科学出版社，2003，

FIGURE1. 8

[25] 李兴，潘卫，邱宗荫等．中华肝脏病杂志．2005，**13**：271

[26] 李兴，潘卫，邱宗荫等.癌症．2005，**24**：1327

[27] 于世林．高效液相色谱方法及应用．北京:化学工业出版社，2005．273

[28] Wagner K，Racaityte K，Unger K ，Miliotis T，et al. *J. Chromatogr. A*. 2000，**893**：293

[29] Cottingham K. *Anal Chem*. 2004，**76**：331A

[30] (澳)辛普森 R J. Purifying proteins for proteomics(影印版)．北京:科学出版社，2004．97

[31] Xie C H，Ye M L，Jiang X G et al. *Mol. Cell. Proteomics*. 2006，**5**：454

[32] Bailey J. Agilent technologies. Wilmington，DE，USA

[33] Merrell K，Soutbwick K，Graves S W. *J. Biomol. Tech*. 2004，**15**：238

[34] Mann M，Meng C K，Fenn J B. *Anal Chem*. 1989，**54**：1702

[35] Swiderek K，Alpert A，Heckendorf A et al. *Methods Rev*. 1997，17

[36] Gygi S P，Rist B，Gerber S A et al. *Nat. Biotechnol*. 1999，**17**：994

[37] Li JX，Steen H，Gygi S P. *Mol.Cell. Proteomics*. 2003，**2**：1198

[38] Hansen K C，Schmitt-Ulms G，Chalkley R J et al. *Mol.Cell. Proteomics*. 2003，**2**：299

[39] Yi E C，Li X J，Cooke K et al. *Protemics*. 2005，**5**：380

[40] Lueking A，Horn M，Eickhoff H. *Anal. Biochem*. 1999，**270**：103

[41] Merchant M，Weinberger S R. *Electrophoresis*. 2000，**21**：1164

[42] CIPHERGEN:ProteinChip® Products & Services Catalog,October 2004

[43] T ang N，Tornatore P，Weinberger S R. *Mass Spectrom. Rev*. 2004，**23**：34

[44] Seibert V，Ebert M P，Buschmann T. *Brief Funct. Genomic Proteomic*. 2005，**4**：16

[45] Srinivas P R，Verma M，Zhao Y. *Clin. Chem*. 2002，**48**：1160

[46] Wilson W D. *Science*. 2002，**295**：2103

[47] BIACORE：Product Catalog 2005

第 12 章　代 谢 组 学

代谢组学(metabonomics)是 Nicholson 等[1] 1999 年利用核磁共振方法进行药物毒理学研究时提出的一种新方法。它是通过考察生物体系受到刺激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)其代谢产物的变化或其随时间的变化,从而探明生物体系的代谢途径的一种技术[2]。与基因组学、转录组学和蛋白质组学相对应,代谢组学是一门对某一生物或细胞所有低分子质量代谢产物进行定性和定量分析,以监测活细胞中化学变化的科学。

根据研究的对象和目的不同,代谢组学分为以下 4 个研究层次[3]:①代谢靶标分析(target analysis),某个或某几个特定组分的分析;②代谢轮廓分析(metabolic profiling analysis),少数预设的一些代谢产物的定量分析,如某一类结构、性质相关的化合物(氨基酸、有机酸、顺二醇类)或某一代谢途径的所有中间产物或多条代谢途径的标志性组分;③代谢组学(metabolomics),在限定条件下的特定生物样品中所有代谢组分的定性和定量;④代谢指纹分析(matabolie fingerprinting analysis),不分离鉴定具体单一组分,而是对样品进行快速分类(如表型的快速鉴定)。严格地说,只有第③层次才是真正意义上的代谢组学研究。

代谢组学和其他组学技术比较,优点在于:研究对象为基因表达的终产物,样品方便易得。它将为疾病诊断和药效评价等领域提供一种方便快捷的研究手段,为生命科学的发展提供一种现代化的实验技术手段。

12.1　代谢组学的研究方向

代谢组学这一技术手段发展十分迅速,目前已经在毒理学、临床诊断、药物开发、植物学、营养科学等研究领域得到了广泛的应用。对于毒理的研究是目前代谢组学应用最热的领域;药物和疾病诊断代谢组学研究在最近一两年有快速攀升的趋势。目前代谢组学技术的应用范围已越来越广,在各学科广泛交叉的科技新时代,代谢组学的学科界限已被打破,除所讨论的 5 个方面外,在环境学、生理学等方面的应用也已凸现出来。

1) 毒理代谢组学

毒理代谢组学是将受试物作用于动物(细胞、组织),收集所需的代谢物,通过检测代谢物组分,再用生物信息学的手段分析处理所获得数据,评价某动物对某化

学物的代谢反应状态。当毒物与细胞或者组织相互作用的时候，改变了关键细胞代谢中内源性物质的比例、浓度，而这些变化最终都会体现到体液组成的变化上。根据这个原理，通过测定体液的组成变化，研究者就能得到关于外源性化合物与生物体作用的位点、强弱、效果以及机制等方面的信息。代谢组学预期通过3个阶段来实现毒理的研究。第一个阶段：通过分析，区分出正常样本和中毒样本，也是最基本的阶段；第二个阶段：找出异常样本(中毒样本)中某些具特殊机制的毒性去预测新药的毒性；最后一个阶段：针对导致异常样本与正常样本差异的部分去寻找生物标记物，并由此说明中毒机制。代谢组学可运用于不同种类的实验动物，因为这些动物是以其体液的内源性代谢模式为基础的，动物品系之间“沉默基因”(silent-gene)功能的差异能够通过几个关键性的中间途径影响代谢物的排出[4]。品系之间代谢率和受体总数的差异，可以帮助解释化学物对不同动物的毒性差异及其潜在毒性和内源性途径的关联。Muireann 等[5]运用转录组学和代谢组学相结合的技术研究乙酰氨基酚对肝脏毒性而引起的糖和脂类的改变，发现糖、脂类相关基因表达改变的水平和代谢变化的结果是一致的，基因表达的改变出现于代谢紊乱之前，随后和代谢紊乱并行。

毒理学研究是代谢组学研究中一个重要的方向，多数的毒理研究工作是与药物研究相结合的，即将已知的模型药物注入动物体内，分析动物血液、尿液等体液的组成变化，来研究药物的毒性。代谢组学研究缩短了新药安全性研究的周期，能够快速、有效地分析多条代谢通路，帮助定位靶组织及判定毒副作用程度，寻找相应的生物学标志。Z24 是新开发的抗肿瘤药物，王全军[6]通过测定 Z24 给予大鼠血液、尿液、肝脏萃取物代谢物组学的改变，以了解 Z24 的毒理机制。大鼠血浆、尿液和组织萃取液的^{1}H NMR 谱经主成分分析发现，由于 Z24 的毒性作用使尿液中的亮氨酸、乳酸、柠檬酸、甲基胍、肌氨酸、琥珀酸、顺乌头酸、苹果酸、己二酸等代谢产物都发生了明显的改变，乳酸、丙酮酸、丙氨酸、赖氨酸、葡萄糖和牛磺酸等代谢成分也在血浆和肝脏水溶性萃取液中发生了明显的改变，分析这些内源性代谢产物的形成、转移机制和过程可提示 Z24 肝毒性发生的潜在原因。Z24 可能的毒性作用机制是 Z24 通过诱导 Bcl-xl 蛋白表达的降低或 Z24 的代谢产物直接与死亡受体相结合，激活 DR 所介导的信号途径而使肝细胞发生凋亡。由于 Z24 的毒性作用，使机体线粒体的功能发生障碍，从而影响到能量代谢中三羧酸循环和糖酵解途径的改变和脂肪酸 β 氧化的不足。代谢组学技术在新药研发中具有重要的应用价值，是进行药物毒性筛选和药物毒性作用机制研究的理想工具。

2）药物代谢组学

药物代谢组学是在药物治疗和干预生命体的过程中，通过对药物自身代谢以及生物体内源性物质代谢的所有产物进行高通量的定性、定量分析，最终阐明药物

作用于生命体的本质过程,开发新的药物。代谢组学作为一种系统方法,能在鉴别和确证药理和疾病模型上发挥作用。药物代谢组学研究可以区别不同种属、不同品系动物模型的代谢状态,鉴别与人体疾病状态的差异,寻找人类疾病、药效和毒性的适宜动物模型。在用动物实验的结果或细胞水平的实验结果预测人的实验结果中,生物标志物起着桥梁的作用。Beaudry 等[7]应用了几种串联质谱技术(包括Q3 全扫描、母离子扫描和中性丢失扫描),以小鼠为测试对象,对分子结构中含有大量的氧化位点的药物——普萘洛尔(propranolol)的代谢轮廓进行了分析,在尿液中检测到了单羟基化和二羟基化的代谢产物以及有立体异构体的单羟基化和二羟基化的普萘洛尔葡糖苷酸(propranolol glucuronides)和普萘洛尔葡糖醛酸(propranolol glucuronic acid),根据这些结果,提出了普萘洛尔的生物转化途径。

代谢组学研究"代谢指纹图谱"不仅研究药物本身的代谢变化,而且主要是研究药物引起的内源性代谢物的变化,两者结合才能系统全面地反映体内生物化学过程和状态的变化,阐明药物作用的靶点或受体。代谢组学可在新药的开发中很好的监控药物的吸收、分布、代谢、排泄和对药物的毒性进行预测,可在新药研究的早期就对其应用前景做有效的预计,以降低药物研究中的风险性浪费,加速药物开发研制的过程。Plumb 等[8]采用 LC/MS 对鼠尿中 3 种候选药物的代谢情况进行了检测,通过将空白尿液与给药尿液 LC/MS 谱图的比较分析,将 3 种药物的代谢差别在质谱中区分出来,共找出了 10 个差别化合物。Plumb 等[9]利用液相色谱和飞行时间质谱(LC/TOF MS)联用技术在不清楚受试药物结构的情况下对体液中的药物代谢产物进行了检测,结合化学计量学的方法对谱图进行分析,在复杂谱峰中分析出了代谢产物的质谱峰。

3) 诊断代谢组学

诊断代谢组学是通过分析体液组成,运用计量学方法对疾病组和正常组进行分类,获取疾病诱导产生的特殊代谢产物——生物标志物,帮助了解病变过程中机体代谢的途径,辅助临床诊断和治疗。以前对于疾病的诊断主要是通过寻找疾病的一种或几种生物标志物并对它们进行检测,在代谢物组学技术应用于该领域后,随着相应的分析手段和数据处理技术的发展,代谢指纹分析已经成为快速高通量的分析诊断方法。冠心病(CHD)的发病率逐年上升,虽然目前通用的 X 射线血管造影法确诊率高,但创伤大、花费高、副作用多。Brindle 等[10]将通过 X 射线血管造影法明确诊断的患者进行分组,同时用 NMR 技术分析血清样本,建立了合适的模型。借助此模型,对于可疑 CHD 患者诊断的灵敏度高达 92%,特异性为 93%。该模型还可判别 CHD 轻、中、重的严重程度和累及血管的数目,甚至可以细分出轻-中、中-重及轻-重等亚型。

4）植物代谢组学

植物代谢组学是指对植物抽提物中代谢组进行高通量、无偏差全面分析的技术，它研究不同物种、不同基因类型或不同生态类型的植物在不同生长时期或受外界环境某种刺激前后的所有代谢物（即所有小分子成分），并对其进行定性和定量分析，进而找出其中的代谢规律。Tiessen 等[4]用 HPLC 对马铃薯块茎进行了代谢组分析，检测了淀粉合成途径中的一系列底物、中间物、酶及产物量的变化，再通过对野生株和含有异源腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（AGPase）转基因株的马铃薯进行对比研究，提出了淀粉合成途径中一种新的调节机制——在离开母体情况下，马铃薯块茎中淀粉合成关键酶 AGPase 的催化亚基 AGPB 会发生可逆的氧化还原反应形成二聚体，使 AGPase 失活，从而抑制淀粉生成。

代谢组学的很多研究集中在植物的细胞代谢组学这个相对独立的分支。主要是通过研究植物细胞中的代谢组在基因变异或环境因素变化后的相应变化，去研究基因型和表型的关系及揭示一些沉默基因的功能，进一步了解植物的代谢途径[11]。Fiehn 研究组[12]利用 GC/MS 技术通过对不同表型拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的 433 种代谢产物进行代谢组学分析，结合化学计量学方法[主成分分析（PCA）、人工神经元网络（ANN）和等级聚类分析（HCA）]对这些植物的表型进行了分类，找到了 4 种在分类中起着相当重要的作用的代谢物质：苹果酸、柠檬酸、葡萄糖和果糖。

植物代谢组学不仅能对单个代谢物进行全方位分析，更能帮助人们更好地了解生物体中的代谢途径、生物体中各种复杂的相互作用及生物系统对环境和基因变化的响应，并最终着眼于将植物代谢组学和其他组学技术整合起来，从而阐述植物从基因到表型的整套复杂系统的运行机制。

5）营养代谢组学

营养代谢组学是营养基因组学的一部分，营养基因组学是研究营养素和植物化学物质对人体基因的转录、翻译表达以及代谢机制作用的影响的科学，而营养代谢组学主要针对其中的代谢机制这一部分进行研究。食物本身不是单一、简单的组分，而是复杂的混合体系，其作用对象是更加复杂的代谢体系，代谢组学技术正是基于对复杂系统进行研究从而避免了常规方法不能很好的评价食物对人体综合影响的缺陷。运用代谢组学方法进行营养学方面的研究，可以掌握食品在体内代谢的全貌，从而更加全面可靠的评价食物对人体健康的影响。Whitfield 等[13]通过研究食物基体的代谢和维他命在慢性代谢失调中的辅助治疗效果，考察了营养物干预与代谢间的复杂关系，证明了代谢物组学用于营养学的研究的巨大潜力。

12.2　代谢组学的研究方法

代谢组学对代谢过程中的所有物质采取无歧视分析，至今为止，还没有哪一种技术平台可以完全实现这一目的。目前，代谢组学对不同的实际样品以及不同类型的代谢产物分别采取不同的分析方法，力求分析生物体系(如体液和细胞)中的所有代谢产物，在整个过程中都强调尽可能的保留和反映总的代谢产物的信息。完整的代谢组学流程包括样品的采集、预处理、数据的采集和数据的分析及解释。由于实际的研究对象不同，采用的样品采集、预处理技术也就千差万别。这里仅对代谢组学研究中所用的数据采集和数据分析技术做简要的介绍。

12.2.1　数据采集技术

在完成样品的预处理后，对样品中所有代谢物进行分析鉴定是代谢组学研究的关键步骤，也是最困难和最多变的步骤。代谢物组学常用的数据采集手段主要是色谱、质谱及核磁共振，色谱具有高分离度，质谱有高的灵敏度和选择性，核磁共振技术对样品分析具有普适性，并且分析过程对样品不造成破坏。代谢组学分析的对象种类繁多、性质差异很大、浓度范围分布广，要对它们进行无偏向的全面分析，单一的分离分析手段难以胜任。目前常用的分离分析手段是气相色谱和质谱联用(GC-MS)、液相色谱和质谱联用(LC-MS)、毛细管电泳和质谱联用(CE-MS)、核磁共振(NMR)以及傅里叶变换红外光谱与质谱联用(FTIR-MS)。不同的代谢组分析技术有其各自的特点和用途，应根据样品的特性和实验目的，选择最合适的分析方法。

1）核磁共振

核磁共振技术是利用高磁场中原子核对射频辐射的吸收光谱鉴定化合物结构的分析技术，生命科学领域中常用的是氢谱(^{1}H NMR)、碳谱(^{13}C NMR)及磷谱(^{31}P NMR)3种，可用于体液或组织提取液和活体分析两大类。NMR方法具有无损伤性，不会破坏样品的结构和性质，可在接近生理条件下进行实验，并可在一定的温度和缓冲液范围内选择实验条件；可以进行实时和动态的检测；可设计多种编辑手段，实验方法灵活多样。NMR还有一个重要的特点，就是没有偏向性，对所有化合物的灵敏度是一样的。NMR谱中的化学位移、峰面积、耦合常数、弛豫时间均是解析化合物结构的依据，这使得NMR法成为目前代谢研究关注的一种方法。

NMR氢谱的谱峰与样品中各化合物的氢原子是一一对应的，所测样品中的每一个氢原子在图谱中都有其相关的谱峰，图谱中信号的相对强弱反映样品中各组分的相对含量。NMR氢谱能完成代谢产物中大多数化合物的检测，满足了代

谢组学对尽可能多的化合物进行检测的目的。因此,NMR 方法很适合研究代谢产物中的复杂成分。NMR 氢谱测定时样品用量少,一般只需 0.3 ml,一维谱的测定仅需 5 min,为一快速、简便的方法。与色谱法比较,突出的优点是对生物样品的预处理简单,这使得 NMR 法更具实用性。NMR 谱的无损伤特点还使其可以检测整体动物或人体特定器官细胞内的代谢物组。然而由于代谢物的分子小,在数以千计的化合物中,大量的内源性物质,如肌酸酐、马尿酸、蛋白质,^{1}H NMR 的化学位移范围只有 10 ppm,因此在 3～5 ppm 和 6～8 ppm 处存在大量的氨基酸,图谱中可能出现上百个化合物的峰,这些峰相互重叠、干扰,造成了图谱解析的困难,生物标志物(biomarker)常常受到与测定不相关物质的干扰。因此一般 NMR 就难以发挥其作用,高分辨核磁共振(high-resolution NMR)则成为强有力的武器。采用高分辨核磁共振仪,因其具有较好的灵敏度,信号分散,使图谱容易解析。

以氢谱(^{1}H NMR)为例,将准备好的生物标本(包括各种体液或组织提取液)直接上样检测即可。对 ^{1}H NMR 谱图以 0.04 ppm 为单位,将谱图划分成若干区域,并对所有区域进行积分,然后将积分值归一化后输出。所得的^{1}H NMR 谱峰与样品中各化合物的氢原子对应。根据一定的规则或与标准氢谱比照可以直接鉴定出代谢物的化学成分,信号的相对强弱则反映了各成分的相对含量。不同样品的代谢物图谱有其特质性,类似于样品的“指纹”。对这种特质性进行区分、鉴定,被称为“代谢指纹分析”(metabolic fingerprint analysis)[14],能帮助找出机体代谢的共性与个性。

代谢组学研究中的主要样品是尿液和血清[15],通常只需要简单的前处理。对于尿样,需要通过离心除去固体悬浮物质,然后加入磷酸缓冲溶液,保证所有的样品的 pH 都在一个很小的范围内,这样才能保证所得到的谱图中相同化合物的谱峰在相同的位置。对于尿样,常用的实验方法是 1D^{1}H 谱,通常采用加预饱和的 1D NOESY 脉冲序列,这样可以得到较好的水峰抑制效果和较平直的基线。同时采用较高的数字分辨率和较长的弛豫延迟,以保证能够区分化学位移相近的谱峰,且能够得到准确的积分。而对于血清样品,则需要采用弛豫编辑[16]或扩散编辑[17]的方法来分别观测小分子和大分子的谱峰。

随着 NMR 技术的发展,以前用于固体的魔角旋转(magic angle spinning, MAS)技术被移植到液体领域,使得人们可以研究以前难以用液体 NMR 研究的样品,如器官组织样品。MAS 技术让样品与磁场方向成 54.7°旋转,从而克服了由偶极耦合(dipolar coopling)引起的线展宽、化学位移的各向异性。利用 MAS 技术,人们可以得到完整的组织样品高分辨谱图[18],样品中仅加入非常少量的 D_2O 而不必进行预处理,样品量只需约 10 mg。MAS 技术的使用扩展了代谢组学研究的样品范围,同时可以更全面地对一个系统进行深入的研究。MAS 技术使得 NMR 谱图的分辨能力明显提高,在代谢物组学的很多领域都得到了广泛的应用。

二维核磁(2D-NMR)用于代谢物组学的研究也十分有效,可提高分辨力,清楚准确地反映出各种复杂分子结构中各种原子之间的链接、耦合及空间信息。可以通过同核^1H-^1H 全相关谱(total correlation spectroscopy,TOCSY)研究分子结构中各种氢的相关关系,再通过异核相关谱(heteronuclear multipe quantum coherence,HMQC,heteronuclear multiple bond coherence,HMBC)来研究分子结构中碳与氢的互相键合与耦合关系,还可以通过空间效应谱(two-dimensiond nuclear overhauser effect correlation spectroscopy,NOESY)来研究更为复杂的分子空间立体结构。另外采用^{13}C-NMR 技术,比^1H-NMR 有较高的分辨率和灵敏度。因此 NMR 仍是当前代谢物组学研究的主要技术。但是 NMR 的分辨能力毕竟有限,灵敏度也不高,对于浓度相差很大的成分也无法同时分析,在复杂系统分析中应用尚有难度。体液所含组分众多,得到的核磁谱图往往很复杂,单独采用一种 NMR 很难对复杂的产物组分进行指认,因此,需要将 NMR 分析手段与其他各种色谱技术进行联用,才能成为代谢物组学研究的强大的手段。

2) 色谱技术

色谱技术因其卓越的分离性能、高灵敏度已被广泛用于复杂体系(如体液)中的靶标分析(如标记物分析)。色谱技术用于代谢组学的研究,存在的主要问题是大量色谱峰的识别以及方法的重现性问题。Pham-Tuan 等[19]全面考察了 HPLC 用于生物样品高通量的代谢物组学研究,提出一种利用短整体柱配以大流速、快梯度洗脱的分析方法。该方法能快速分析体液样品,得到多信息代谢指纹图谱,且容易与 MS 联用,显示了液相色谱利用新发展的技术实现高通量分析的潜力。

3) 质谱、色谱质谱联用

质谱技术是将离子化的原子、分子或分子碎片按质量或是质荷比(m/z)大小顺序排列成图谱,并在此基础上,进行物质的定性或定量分析。质谱图中每个峰所代表的化合物的分子结构可以通过其碎片峰的类型和质荷比(m/z)结合有关质谱数据库来进行鉴定,其含量可以通过峰面积的大小来测定。质谱法具有如下优点:①超微量;②快速(数分钟内完成一次测试);③能同时提供分析样品的相对分子质量信息和结构信息;④既能进行定性分析又能进行定量分析;⑤能有效的与各种色谱法在线联用,成为分析复杂体系的有力手段。MS 的选择性和灵敏度都较好,但存在离子化程度和基质干扰等问题,离子化过程存在的电离歧视效应与代谢物组学的研究思想存在矛盾,是质谱方法需要迫切解决的技术瓶颈。

色谱是最常用和有效的分离分析工具,其与质谱的联用可以完成从成分分离到鉴定的工作。MS 与各种色谱技术的联用使得质谱技术在代谢物组学的研究中起着十分重要的作用,如液质联用、气质联用等对于分离代谢产物及分析复杂生物

基质中代谢产物的结构有着 NMR 所不具有的优势。GC/MS 和 LC/MS 可以同时检测出数百种化合物，包括糖类、有机酸、氨基酸、脂肪酸等和大量不同的次生代谢物[12,20]。

GC/MS 的优势在于能够提供较高的分辨率和检测灵敏度，且相对较为经济，并且有可供参考、比较的标准谱图库，可方便地得到待分析代谢组分的定性结果。GC/MS 分析时，首先需对样品进行衍生化处理，以增加样品的稳定性和挥发性。GC/MS 只能对其中的挥发性组分实现直接分析，为此不能得到体系中难挥发的大多数代谢组分的信息，也无法分析膜脂等热不稳定性的物质和相对分子质量较大的代谢产物。

LC/MS 采用 LC 作为其主要的分离手段，增强了其分辨能力，与 MS 或MS/MS 的联用可以得到代谢组分的结构信息。它与 GC 相比预处理相对简单，在进样前不需进行衍生化处理，适合那些不稳定、不易衍生化、不易挥发和相对分子质量较大的化合物。HPLC/MS 选择性和灵敏度都较好，但分析的时间相对较长，且需依赖纯的参照物。叶炼[21]采用 LC/MS/MS 对血清胆汁酸进行代谢轮廓分析，既不用水解，也不需衍生，同时完成对血清游离甘氨酸和牛磺胆汁酸的测定。LC/MS/MS技术逐渐被广泛地用于代谢组学的研究中。

由 LC/MS 发展而来的毛细管电泳质谱联用技术（CE/MS）也被应用到代谢组学研究。CE/MS 分离样品的速度和效率比普通的色谱质谱联用要高得多，且耗时很短，往往在 10min 内就能完成一个样品的分析过程，代表着代谢组分析的一个方向。Tolstikov 等[22]用 CE/MS 对拟南芥进行代谢组分析，分离效果远远超过了 Fiehn 等用 GC/MS 进行的先期工作，检测到超过 700 个的不同的色谱峰值，其中包括许多以前未检测到的脂类化合物及次生代谢物。

4）傅里叶变换红外光谱质谱联用

傅里叶变换红外光谱质谱（FTIR/MS）联用也被应用于代谢组学分析。FTIR 主要测定样品中各成分的功能基团和高极性键的振动，对特定的化学结构有特定的吸收频率，通过测定样品的红外吸收频率和强度，可以识别各个成分。FTIR 具有扫描速度快、光通量大、高分辨率、高信噪比及测定光谱范围宽的特点，但不可区分异构物，且组分片段和一些络合离子也对其有影响，由于离子抑制不能进行定量分析。与 NMR 一样，FTIR 不会对所分析的样品造成破坏，但灵敏度比 MS 差，不适合于痕量化合物的鉴定。Aharoni 等[23]利用高分辨率的 FTIR/MS 联用仪器对凤梨、草莓（*Fragaria ananassa*）组织进行了分析，根据不同的质荷比找到了 5844 个不同质量的物质，并对化合物中高含量的元素的精确质量测定估计了其中一半以上物质的化学结构式。结果表明，在草莓的不同组织中都含有多种类的初生代谢物（如氨基酸、脂肪酸和碳水化合物）及次生代谢物（如类黄酮和萜类化合物）。

12.2.2　代谢组学研究中的数据分析

代谢组学研究得到的是大量的、多维的信息。为了充分抽提所得到的数据中的潜在信息，往往需要运用多种数据分析技术，将多维、分散的数据进行总结、分类及判别分析，寻找数据间的定性、定量关系，挖掘数据中蕴藏的生物学意义，以便阐述其与机体代谢间的关系。为了充分利用代谢组学产生的有用信息，通常需要采用化学计量学方法。目前分析数据的主要方法有化学模式识别和基于理论的系统鉴定法，前者主要包括无监督方法（如聚类分析、主成分分析、自组织图等）和有监督方法（如非线性回归、判别式功能分析、遗传算法、遗传编程、前馈神经网络、支持载体机器、酵母共反应功能分析等），后者包括非线性动力学、化学动力学和代谢控制分析。在此主要介绍化学模式识别（chemical pattern recognition）方法。

所谓模式是指事物或事件的各种可测量的和不可测量的集合，而人们对客观世界的认识就是对模式的识别。模式识别是鉴于数据矩阵提供的信息，用数学方法识别具有一定模式的样本和变量，其功能是对样本进行分类或判别。简言之，就是研究“物以类聚”的一种方法。比如医生给患者看病，通过各种方式了解病情，根据检查结果给出诊断，就是模式识别。

这里首先介绍数据的预处理，然后针对代谢组学研究中的数据分析方法做简要介绍。

1. 数据预处理

代谢组学研究所得的实验数据，通常可以排列为一个 m 行 n 列的矩阵 X。行表示 m 个对象（样本），列表示 n 个特征。对象可以是血清、尿液、胆汁等，而这些对象的特征是通过仪器检测分析所得的谱图、结构特征、物理性质等。

$$X=\begin{bmatrix} \chi_{11}, & \chi_{12}, & \cdots & \chi_{1n} \\ \chi_{21}, & \chi_{22}, & \cdots & \chi_{2n} \\ \vdots, & \vdots, & \vdots, & \vdots \\ \chi_{m1}, & \chi_{m2}, & \cdots, & \chi_{mn} \end{bmatrix}$$

每个对象的数据为一个 n 维矢量。数据间不仅量纲可能不同，其绝对值大小也可能会有几个数量级之差。数据未经处理而直接用于统计分析，易于突出大数据属性的作用而遗失小数据信息。为了避免量纲和数据均值不同对数据分析造成的影响，通常应用标度化方法使各变量的变化幅度处于同一水平，即对数据集进行预处理。

数据预处理（data preprocessing）首先需要考察数据的完整性，通常遗漏的数据用行或列的平均值来代替，这并不妨碍利用数学方法进行数据分析。如果某特

征参数与其他参数具有高度相关性，对于冗余的参数、常数参数等，可从原始数据中删除。下面介绍几种常用的标度化方法。

1）值域调整

$$x_{ij,\text{new}} = \frac{x_{ij,\text{old}} - x_{j,\text{min}}}{x_{j,\text{max}} - x_{j,\text{min}}} \qquad 0 \leqslant x_{ij,\text{new}} \leqslant 1$$

式中，$x_{ij,\text{new}}$表示第 i 个样本经换算后所得的第 j 分量；$x_{ij,\text{old}}$表示第 i 个样本的第 j 分量；$x_{j,\text{min}}$表示原有第 j 分量的最小值；$x_{j,\text{max}}$表示原有第 j 分量的最大值。

值域调整(range scaling)法的缺点是若数据集中有一个数值很大，则其余各数据间差值不明显。

2）自标度化

$$x_{ij,\text{new}} = \frac{x_{ij,\text{old}} - \overline{x_j}}{s_j}$$

$$s_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_{ij} - \overline{x_j})^2}{n-1}}$$

式中，$\overline{x_j}$表示变量 j 的均值；s_j 表示变量 j 的标准差；n 表示样本的数目。

自标度化(autoscaling)将数据的均值调整为 0，标准差调整为 1，向量的模长调整为 $\sqrt{n-1}$ 。

3）标准化

标准化(normalization)预处理的方法很多，对于不同的仪器应用不同的方法。在某些情况下，可将一个数据向量的模长标准化为 1，即

$$x_{ij,\text{new}} = \frac{x_{ij,\text{old}}}{\| x_j \|}$$

$$\| x_j \| = \sqrt{x_{1j}^2 + x_{2j}^2 + \cdots + x_{nj}^2}$$

4）对数变换

$$x_{ij,\text{new}} = \lg(x_{ij}) \qquad x_{ij} > 0$$

当变量的动态范围较大，如相差几个数量级时，可采用对数变换(logarithmic transformation)法。

2. 无监督方法

无监督方法是指利用聚类分析法或通过将高维数据投影到低维空间并对分析

数据进行分组，而不需要已知类别关系的样本指导，也称为无管理识别方法。代谢组学中的无监督方法用于从原始谱图信息或预处理后的数据中对样本进行归类，并采用相应的可视化技术直观地表达出来。该方法将得到的分类信息与样本的原始信息进行比较，建立代谢产物与原始信息之间的联系，筛选与原始信息相关的标记物，进而考察其中的代谢途径。无监督方法主要包括主成分分析、系统聚类分析、非线性映射法和自组织图等。

1）主成分分析

代谢组学研究中，最常用的简单有效的模式识别方法是主成分分析法（principal component analysis，PCA）。PCA 是将分散在一组变量上的信息集中到某几个综合指标即主成分（principal component，PC）上，利用这些主成分描述机体代谢的变化情况，起着数据降维的作用。主成分是由原始变量按照一定的权重经线性组合而成的新变量，这些变量具有以下性质：①每一个 PC 之间都是正交的；②第一个 PC 包含了数据集的绝大部分方差，第二个次之，以此类推。这样，由前两个或三个 PC 作图，就能够很好地代表数据集所包含的生物化学变化。所得的 PC 图能够直观地描述在施加不同处理前后生物体内的代谢模式变化。每一个样本在 PC 图上的位置由它的代谢反应决定。将未知样本的数据经与已知类别数据相同的预处理后，就可以确定它在 PC 图上的位置，并可据此推测它的类别[24]。通常，从处于相似病理生理状态的个体上得到的样本具有相似的组分，因而它们在 PC 图中也处于相似的位置。许多代谢物之间的相关性很强，使用主成分分析可以从数学上简化变量，即用较少的综合性变量替代原来众多的相关性变量，简化研究过程。原则上如果有 n 个变量，则最多可以提取 n 个主成分，但如果将它们全部提取出来就失去了该方法简化数据的意义。多数情况下提取出前 2～3 个主成分已包含了 90%以上的信息，其他的可以忽略不计。提取出的主成分能包含主要信息即可，不一定非要有准确的实际意义。主成分分析的主要步骤包括原始数据的标准化处理、计算相关系数矩阵、计算特征值和特征向量、计算贡献率和累积贡献率（一般取累积贡献率在 85%以上即可）、计算主成分载荷及主成分得分等。主成分分析中通常可以做主成分得分图（score plot）和主成分载荷图（loading plot）。主成分得分图是以计算得到的样本在第一主成分上的得分为横坐标，以样本在第二个主成分上的得分为纵坐标画出的二维散点图。在得分图上，通常同种类型的指标聚为一类。主成分载荷图是 l_1 对 l_2 作图，反映特征在主成分上的投影，显示各变量间的相关信息。变量间夹角越小，相关性越高。载荷大小是相关性的度量，离原点距离越大，表明该特征的权重越大。

采用主成分分析法对刘春芳等[25]用反相高效液相色谱法（RP-HPLC）测定的正常孕妇、妊娠肝内胆汁淤积症（intrahepatic cholestasis of pregnancy，ICP）患者

和 B 型肝炎患者的血清胆汁酸进行分析，研究血清胆汁酸代谢物轮廓并分析鉴别 B 型肝炎和 ICP。以血清中 9 种胆汁酸甘氨胆酸(glycocholic acid，GCA)、甘氨鹅脱氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid，GCDCA)、甘氨脱氧胆酸(glycodeoxycholic acid，GDCA)、熊脱氧胆酸(ursodeoxycholic acid，UDCA)、胆酸(cholic acid，CA)、甘氨石胆酸(glycolithocholic acid，GLCA)、鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid，CDCA)、脱氧胆酸(deoxycholic acid，DCA)、石胆酸(lithocholic acid，LCA)作为变量，分别以 χ_1，χ_2，χ_3，χ_4，χ_5，χ_6，χ_7，χ_8，χ_9 表示，用 SAS8.2 统计软件进行主成分分析。通过主成分分析，变量转化为 9 种主成分，每一主成分是原始变量间的线性方程。主成分间相互独立，分别求得对应于两个最大特征值的主成分 PC1 和 PC2：

$$PC1 = -0.009622\chi_1 + 0.215805\chi_2 + 0.465255\chi_3 + 0.383839\chi_4 + 0.519895\chi_5 - 0.133123\chi_6 + 0.524823\chi_7 + 0.021679\chi_8 - 0.160061\chi_9;$$

$$PC2 = 0.675291\chi_1 + 0.600408\chi_2 + 0.015369\chi_3 + 0.092313\chi_4 - 0.286524\chi_5 - 0.049875\chi_6 - 0.081998\chi_7 + 0.275826\chi_8 - 0.085719\chi_9;$$

式中，PC1 和 PC2 分别表示第一、二主成分；χ_i 表示原始变量，指对应的 9 种胆汁酸；χ_i 前的系数表示主成分和相应的原始变量间的相关系数，相关系数的绝对值越大，表明主成分对该变量的代表性越大。

由 PC1 和 PC2 关系式可以看出：对第一主成分代表性最大的是 CDCA 和 CA 水平；对第二主成分代表性最大的是 GCA 和 GCDCA 水平。将原始变量数据代入以上两式得到对照组、B 型肝炎组和 ICP 组的主成分得分，以 PC1 和 PC2 为投影轴作散点图，即得到主成分得分图，如图 12.1 所示。

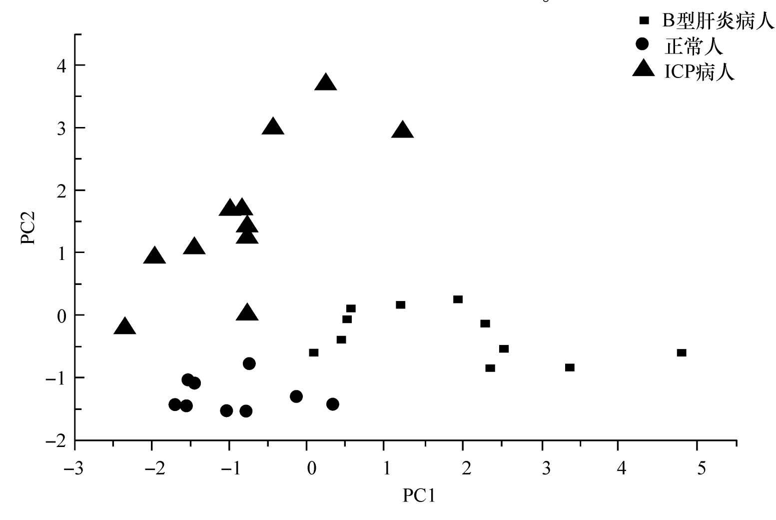


图 12.1　B 型肝炎组、对照组和 ICP 组的主成分得分图

从图12.1中可以看出：对照组血清中9种胆汁酸水平聚在一个很窄的区域，而在B型肝炎组和ICP组中则较为分散，但3组能较好地聚类。ICP组的第二主成分得分较高，而第一主成分得分相对较低，表明ICP组患者的GCA和GCDCA水平相对较高；B型肝炎患者的第一主成分得分高，而第二主成分得分较ICP组低但较正常对照组稍高，表明B型肝炎患者的CDCA和CA水平相对较高。据此可为临床医生提供ICP和B型肝炎诊断和鉴别诊断的依据。

Serkova等[26]在免疫抑制剂的毒性动力学监测的生物标志物——基于NMR的定量血液代谢组学研究中，利用高分辨^{1}H-NMR测定正常鼠血清和独立或混合使用环孢素A（cyclosporin A，CsA）、西罗莫司（simlimus，SRL）、依维莫司（everolimus，RAD）三种免疫抑制剂处理的鼠血清预测代谢物毒性，并定性、定量筛选特定的代谢物生物标志物。运用AMIX3.1软件进行主成分分析处理实验数据，如图12.2所示。

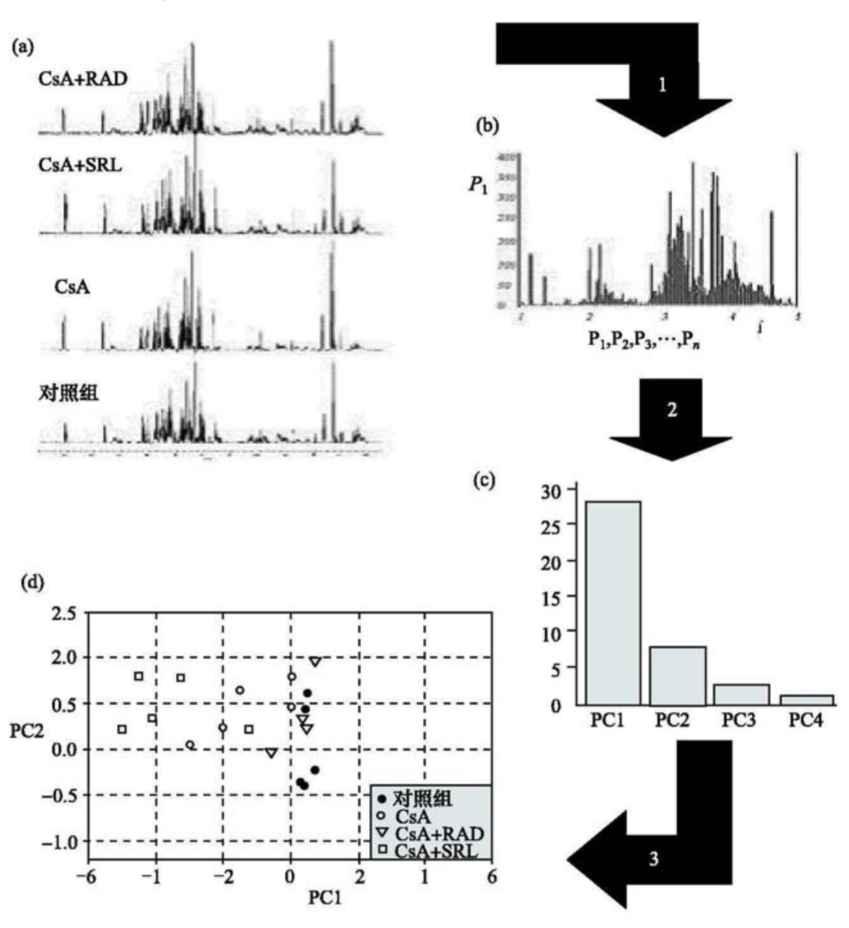


图12.2 基于^{1}H-NMR的鼠血清代谢组学方法

在图 12.2 中,(a)是不同处理组的鼠血清^{1}H-NMR 谱图;(b)是经预处理把谱图数据转化为用于主成分分析的数据;(c)是前 4 种主成分在 PCA 中的贡献大小直方图;(d)是不同处理组的鼠血清样本的主成分 1 和主成分 2 载荷图。结果表明 CsA+RAD 处理组与对照组相似;CsA 处理组能与对照组区分开;而 CsA+SRL 处理组不仅能与对照组分开,而且能与 CsA 处理组分开。CsA+SRL 的联合运用说明联合免疫抑制剂毒性不能基于每一种免疫抑制剂独立施加处理而被预测,通常需要完全的联合免疫抑制剂的预临床评价。

2) 系统聚类分析

系统聚类法(hierarchical cluster analysis,HCA)是先将 n 个样本分别看作一类,然后规定样本间的距离和类间的距离,将距离最小的两个样本合并成一个新的类,成为(n-1)个类,再计算各类间的距离,将距离最小的两类合并成一类,这样每次通过合并距离最小的两类样本而减少一类,直至所有样本都聚为一类。系统聚类分析的目的是使复杂数据简化并突出数据间的自然群组关系。系统聚类分析最终输出一个系统树图,使类群关系得以可视化。一个典型的系统聚类方法就是生物的分类,分为“界”、“门”、“纲”、“目”、“种”等,形成一个树图结构。将不同样本先后归为一类需要规定一个判据,即相似度,它是系统聚类算法的基础。假设在被考察的目标中,样本 p 和样本 q 是最相似的,那么它们就可以合并组成一个新类 p*。l 为其他样本或类。相似性的量度通常以“距离”来体现,常见的有以下 3 种:

(1) 平均距离关联法(average linkage):

$$D_{ip*} = (D_{ip} + D_{iq})/2$$

(2) 最短距离关联法(single linkage):

$$D_{ip*} = \min(D_{ip}, D_{iq})$$

(3) 最长距离关联法(complete linkage):

$$D_{ip*} = \max(D_{ip}, D_{iq})$$

式中,D_{ip}表示样本 p 与其他样本(或类)i 的相似性;D_{iq}表示样本 q 与其他样本(或类)i 的相似性;D_{ip*}表示所形成的新类 p* 与其他样本(或类)i 间的相似性。

聚类分析树图能提供关于样本和样本间相似性关系的形象思维图像。只要能确定样本的类别,就可以应用 t-检验或多元变量分析来寻找各类别间代谢物水平在统计学上的显著性差异。

Beckonert 等[27]在研究药物毒性时指出 HCA 不仅能识别出药物损害器官的显著性差异,还能反映样本间的相似性,如图 12.3 所示。在最右边部分 1、2 两种药物对肝脏的损伤聚为一类,显示 1、2 两种药物为致肝毒性药物;2、4 两种药物对肾脏的损伤聚为一类,显示 2、4 两种药物致肾毒性;药物 2 的其他处理方式聚为一类。尽管药物毒性导致受损部位不一致,但是除了最右边部分外的其他几个群组构成都不单

一，即并非致肝毒性药物聚集在一起，致肾毒性药物聚集在一起。这可能是由于药物不只作用于单一器官，例如 L3、L5、L7、K1、K3 这组，通过研究 K1 和 K3 两种药物的代谢物，发现它们均导致肝糖含量降低，说明它们对肝脏也有一定影响。结果表明尿液 NMR 谱图的代谢组学分析对于识别毒性组别间的相似性非常敏感。

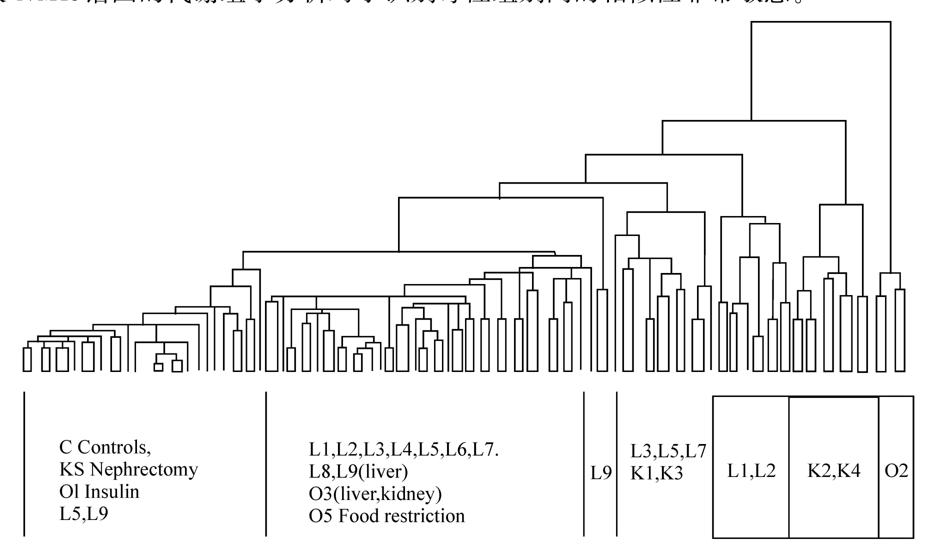


图 12.3　不同药物作用于不同器官的毒性研究 HCA 树图

L 代表肝，K 代表肾，O 代表其他处理方式，数字代表不同的药物

3）非线性映射法

非线性映射法（non-linear mapping，NLM）是模式识别方法中原理最简单的一种。该方法首先计算在原始 d 维空间中所有数据点间的距离，然后将样本点放置在一个随机的或由主成分构造的二维或三维空间中。这个空间不断被调整，遵循的原则是尽量使样本点移至低维空间后点与点之间的距离与它们在原空间中的距离一致。而在实际工作中，多维空间的点投影到低维空间后保持点与点间的距离不变是不可能的，通常需要不断调节 d 维空间中的 n 个矢量至误差达到最小值或预先给定值为止。

实际计算中要注意以下两个问题：①必须首先确定初值空间。如果初值离收敛点太远，迭代难以收敛到最小。②当原空间维数太高或样本数太大时，收敛困难，易使迭代失败。非线性映射法具有非线性且能较好地保持原数据间相互关系，在代谢组学分析中有广泛的应用前景。

4）自组织图

自组织图（self-organizing map，SOM），又名 Kohonen 神经网络，主要用于无

监督模式识别，是竞争网络模型。自组织图的整个网络为单层结构，是一维神经元或二维神经元排列，所有样本或神经元输入节点时所关联的权重向量都非常相似，所有神经元共用一个转移函数。当信号输入后通过竞争来决定哪个神经元获得兴奋(activated)。Kohonen 在训练阶段调整网络权重时，发现以获胜神经元为中心的某一半径内所有神经元均获得不同程度的兴奋，其权重均进行了相应调整。随着训练过程的进行，获胜神经元的领域逐渐缩小，直到只包含获胜神经元本身为止。Kohonen 网络可以将高维数据投影到二维空间，在保持数据拓扑关系不变的情况下，对数据进行有效压缩。鉴于 Kohonen 的非线性特性，且其研究结果可用于分类，可将其用于代谢组学复杂数据的处理。

3. 有监督方法

有监督方法需要有一个训练集(training set)，在训练集中，各样本类别是已知的，如一些样本属于 A 类，另一些样本属于 B 类，将训练集中样本的类别输入计算机，让计算机通过训练或学习掌握一定的识别规律后，再去预测未知样本的类别，也称为有管理识别方法。训练集是由为建立模型而被分析的数据元组形成。训练集中的单个元组称为训练样本，每个训练样本有一个类别标记。在代谢组学中，有监督方法用于建立类别间的数学模型，使各类样本间达到最大分离，并利用建立的多参数模型对未知的样本进行预测。在这种方法中经常需要建立用来确认样本归类的确认集(validation set)和用来测试模型性能的测试集(test set)。所谓测试集是从训练集以外独立采样，主要用于测试分类模型的准确度，对类标号未知的新数据进行分类。确认集是从训练集和测试集以外独立采样，主要用于帮助做设计决策，确认样本类别。数据集包括训练集、测试集和确认集。有监督方法主要包括偏最小二乘法、线性判别式法、SIMCA 和人工神经网络等。

1) 偏最小二乘法

偏最小二乘法(partial least squares, PLS)从 20 世纪 80 年代开始用于化学研究，现已成为化学计量学中颇受推崇的多变量校正方法，在代谢组学的数据处理中也得到了广泛的应用。偏最小二乘法是基于因子分析的多变量校正方法，同时它又是主成分回归的发展。在主成分回归方法中，对测量矩阵 Y 进行主成分分析，以抽象因子进行回归，但对浓度矩阵 X 未加任何处理。而偏最小二乘法同时对测量矩阵 Y 和浓度矩阵 X 进行主成分分解，并以它们的主因子进行回归，进一步提高了方法的可靠性。事实上，偏最小二乘法并不是独立地对 X 矩阵和 Y 矩阵进行主成分分析，而是通过迭代的方法，在分解 X 矩阵时考虑 Y 矩阵的因素，在分解 Y 矩阵时考虑 X 矩阵的因素，将两个独立的主成分分析过程合二为一。偏最小二乘法常用的算法是非线性迭代偏最小二乘法(nonlinear iterative partial least

squares, NIPALS)。

偏最小二乘法研究两个矩阵间的相关关系，分析前往往要做一些数据校正，以期得到更好的预测效果。Wold[28]提出了正交信号校正(orthogonal signal correction, OSC)方法，用来去除 X 矩阵中与 Y 矩阵不相关的部分，通常是噪声或系统误差。这种校正方法不仅成功地应用于近红外谱图中，对 NMR 谱图也非常有效。Beckwith-Hall[29]发现 OSC 在处理生物体液谱图时不仅可以去除不同仪器间的系统差异和不同实验时间对测定数据的影响，还可以使原本无法分开的一些生理或病理状态区分开来。除了 OSC 这种校正方法外，Keun 等[30]提出了一种根据变量稳定性而赋以相应权值的方法。实验证明，它比 OSC 更有效，且不容易出现过拟合现象(overfitting)。尿液代谢物分析发现，占数据变异信息主导地位的往往是系统自身的生化噪声，而不是病理状态引起的代谢变化。该方法通过给变化较大的变量赋以较小的权值削弱了这种影响。

Griffin 等[31]在研究杜兴型肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)小鼠的肌营养不良蛋白(dystrophin)和肌营养不良相关蛋白(utrophin)表达的代谢物轮廓分析中多次采用偏最小二乘法建立模型并处理数据。他们在患肌营养不良的小鼠的横膈膜组织中肌营养不良蛋白和肌营养不良相关蛋白表达的代谢物轮廓分析中建立了一个高分辨^{1}H-NMR 谱所得数据的两组分 PLS 模型(经 Pareto 规范化数据预处理)，如图 12.4 所示。mdx 组小鼠未表达肌营养不良蛋白(dystrophin)；Tg/Dmd^{mdx}组小鼠是由在骨骼肌而不是心脏中表达全序列长度的肌营养不良相关蛋白(utrophin)的转基因小鼠和 mdx 小鼠杂交而产生的肌膜局部缺乏肌营养不良蛋白但存在肌营养不良相关蛋白的小鼠。结果显示对照组和 mdx 组通过第二主成分可区分开来；而 Tg/Dmd^{mdx}组与 mdx 组、对照组通过第一主成分可区分开。做出每一 PLS 主分的载荷图，可以看出重要的代谢物受蛋白质表达变化的影响。

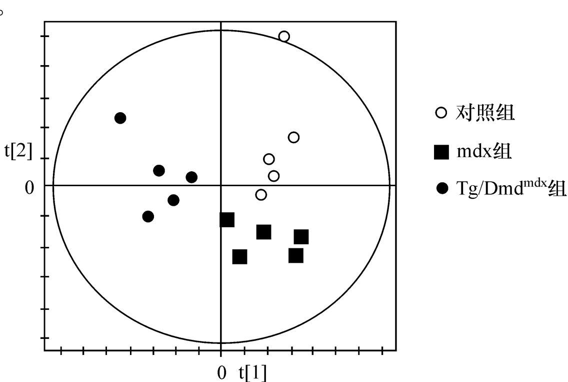


图 12.4　两组分 PLS 模型

2）线性判别式法

线性判别分析(linear discriminant analysis，LDA)最早由 Fisher 提出，它是用已知类别样本的概率密度函数作为线性判别式来对未知样本的归属进行判别。该方法的基本思想是设法找到多变量数据集的最佳投影方向，将高维空间中的变量投影到低维空间，然后再在低维空间中分类，最后对未知样本的类别进行预测。它是一种建立在计算各类样本协方差矩阵基础上的参数统计分析方法，要求各类数据方差较齐，且组间方差大于组内方差。

线性判别分析就数据降维这一点上来说有些类似于主成分分析法，但二者又存在本质差异。主成分分析是选择数据点变异最大的方向作为主成分方向以达到降维的目的；而线性判别分析通常选择能够最大程度地将各类样本分开的分割面(判别函数)作为它的方向。

通常，线性判别分析可与偏最小二乘法联用(PLS-DA)。Brindle 等[10]在基于高通量^{1}H-NMR 的代谢组学快速无创地诊断心脏疾病的存在及严重程度研究中用到 PLS-DA 联用模式识别技术处理患者血清样本代谢组学数据，如图 12.5 所示。

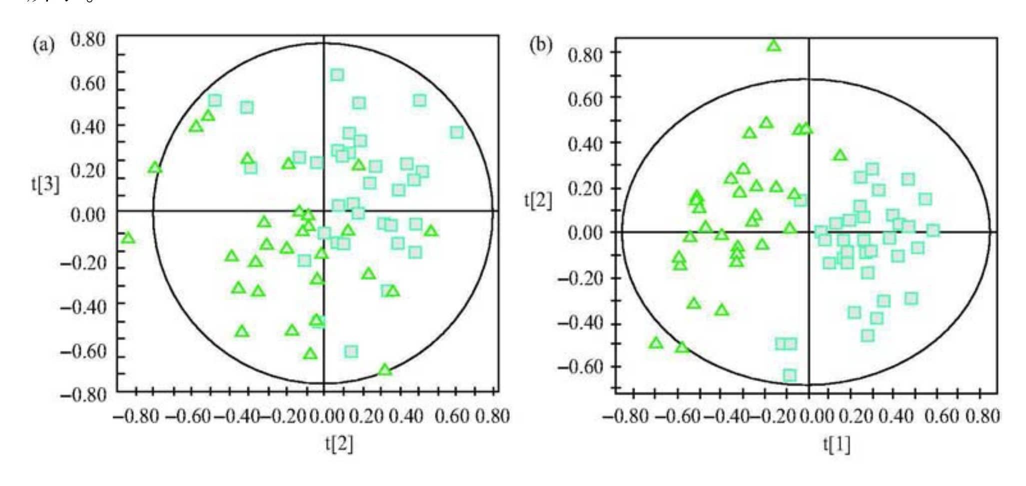


图 12.5　NCA 和 TVD 患者的 PLS-DA 得分图

在图 12.5 中，(a)是冠状动脉正常的患者(patient with normal coronary arteries，简写为 NCA，用▲表示)和患三支病的患者(patient with triple vessel disease，简写为 TVD，用■表示)的血清样本数据的 PLS-DA 分析，最佳分离出现在第二、三主成分(t[2]、t[3])间。尽管两类样本中间有重叠，但是聚类还是很明显的。(b)是 NCA 和 TVD 患者的血清样本数据经 OSC 校正后的 PLS-DA 分析，最佳分离发生在第一、二主成分(t[1]、t[2])间。OSC 能去除不相关的变量干扰，

优化分离，提高多元模式识别结果的准确性，增强该模式识别的预测能力。采用OSC后，TVD组和NCA组的PLS-DA得分图在第一、二主成分间有很好的分离。第一主成分对其影响较大，TVD组第一主成分得分为正值，NCA组第一主成分得分为负值。研究显示，模式识别技术应用于人血清^{1}H-NMR谱图，不仅能够正确诊断冠心病的存在，而且能表明其严重程度。在该模型中，第一主成分的得分为负值，显示存在冠心病，负值越大，显示病情越严重；同时该模型能将三大主要的冠状动脉狭窄的受试者和冠状动脉血管造影正常的受试者区分开，特异度大于90%。该方法提供了适于临床应用的冠心病的准确、无创、快速诊断。

3）SIMCA

SIMCA（soft independent modeling of class analogy）可直译为簇类的独立软模式法，属于类模型方法，即对训练集中同属一类的样本进行主成分分析，建立能表述类别特征的局部软模式，并在此基础上进行样本的分类。对未知样本则测试它与已知类别的模式是否能够拟合，以确定其类别。

SIMCA的基本思路是对样本的数据集分别进行标准化处理，然后分别计算各类主成分数，建立多类主成分模型，评价计算载荷和得分，再对未知样本进行测试并归类。SIMCA常用于寻找每一类样本的独立主成分模型。使用SIMCA法时，样本数与变量数的比例并不十分重要，因为建立模型的依据是数据的投影而不是原始数据本身。模型中的主成分数可通过交叉验证法进行确定。SIMCA可通过专业软件来实现，其中较著名的是Unscrumber软件和Serius软件。

4）人工神经网络

人工神经网络（artificial neural network，ANN）是在研究人脑组织所取得的成果的基础上提出的一种抽象模型。它利用大量简单的处理单元广泛连接组成的人工神经元来模拟大脑的神经网络结构和行为。人工神经网络由输入层、隐蔽层和输出层构成，通常隐蔽层可以是一层或多层。研究表明人工神经网络具有人脑的基本特征，包括学习、记忆、概括、归纳和提取等。人工神经网络主要研究两方面内容：一是将神经网络模拟成神经系统，对其功能进行深入的研究和了解；二是依靠计算机来进行人工神经网络研究，并应用人工神经网络的原理来研究和解决实际问题。代谢组学研究者主要关心的是后者，即利用人工神经网络模式研究代谢组学问题。

人工神经网络模式能有效地对数据模式进行解析和分类，适于处理原因与结果关系不确定的非线性测量数据，而代谢组学中所涉及的数据正是具有这种不确定性特点。人工神经网络技术在代谢组学中已得到了成功的应用。

12.3 展　　望

代谢组学是一个新兴的研究领域,其相关的理论与技术还有待完善。目前代谢组学存在的问题主要有以下几方面:①分离分析手段有限,没有一种分析技术能够同时对所有代谢物进行分析;②缺乏有效的数据分析手段将所得的全部数据进行分析和解释;③代谢组学数据库还没有建立;④如何有效解决代谢组学与基因组学、转录组学和蛋白质组学技术的联用问题。在代谢组学研究中,代谢状态变化迅速,影响因素多,给个体化研究带来很大的困难,建立代谢组学研究的数据库就显得非常重要。这样,其他的研究者就可采用同样的实验方案,将所得的代谢轮廓与数据库中的代谢轮廓进行比较。建立数据库可从以下几方面考虑:①储存有详细的代谢物轮廓,包含所有原始数据和详尽的代谢组学数据的数据库;②基于单种类的数据库,其中储存有相对简单的代谢物轮廓;③储存有在不同生理状态下不同种类的复杂的代谢物轮廓数据的数据库;④罗列有各种生物种属所有已知代谢物数据信息的数据库,采用适当的数据库,能包含代谢物随时空变化的信息;⑤编辑确定的生化信息的数据库;⑥整合基因组和代谢组数据以便能构造代谢数据模型的数据库[32]。

随着研究的深入,代谢组学分析系统的硬件、软件技术都将进一步提高,并朝着整合化、自动化和高通量方向发展。代谢组学研究在药物安全性评价、药理学、环境评价、营养分析、功能基因组研究、疾病预测和诊断等领域将发挥越来越重要的作用。

参考文献

[1] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. *Xenobiotica*. 1999, **29**: 1181

[2] Nicholson J K, Connelly J, Lindon J C et al. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2002, **1**: 153

[3] Taylor J, King R D, Altmann T et al. *Bioinformatics*. 2002, **18**: 241

[4] Tiessen A, Hendriks J H M, Stitt M et al. *The Plant Cell*. 2002, **14**: 2191

[5] Coen M , Ruepp S U, Lindon J C et al. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2004, **35**: 93

[6] 王全军. 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所. 博士论文. 2004

[7] Beaudry F, Le Blanc J C Y, Coutu M et al. *Biomed. Chromatogra*. 1999, **13**: 363

[8] Plumb R S, Stumpf C L, Gorenstein M V et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2002, **16**: 1991

[9] Plumb R S, Stumpf C L, Granger J H et al. *Rapid Commun. Mass spectrum*. 2003, **17**: S632

[10] Brindle J T, Antti H, Hohnes E et al. *Nat. Med*. 2002, **8**: 1439

[11] Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. *Phvtochem*. 2003, **62**: 817～836

[12] Taylor J, King R D, Altmann T et al. *Bioinformatics*. 2002, **18**: S241

[13] Whitfield P D, German A J, Noble P J M. *Br. J. nutr*. 2004, **92**: 549

[14] Bales J R, Higham D P, Howe I et al. *Clin. Chem.* 1984, **30**: 426
[15] Nicholson J K, Wilson I D. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1989, **21**: 449
[16] Tang H, Wang Y, Nicholson J K et al. *Anal. Biochem.* 2004, **325**: 260
[17] Beckwith-Hall B M, Thompson N A, Nicholson J K et al. *Analyst.* 2003, 128: 814
[18] Griffin J L, Cemal C K, Pook M A. *Physiol. Genomics.* 2004, **16**: 334
[19] Pham-Tuan H, Kaskavelis L, Daykin C A et al. *J. Chromatogr. B.* 2003, **789**: 283
[20] Tolstikov V V, Fiehn O. *Annal. Biochem.* 2002, **301**: 298
[21] 叶炼. 重庆医科大学. 硕士论文. 2006
[22] Tolstikov V V, Lommen A, Nakanishi K et al. *Anal. Chem.* 2003, **75**: 6737
[23] Aharoni A, Ric de Vos C H, Verhoeven H A. *OMICS.* 2002, **6**: 217
[24] Holmes E. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1998, **44**: 251
[25] 刘春芳,丁敏,何俊等. 中华检验医学杂志. 2005, **28**: 713
[26] Serkova N J. *Ther. Drug Monit.* 2005, **27**: 733
[27] Bechonert O, Bollard M E, Ebbels T M D et al. *Anal. Chim Acta.* 2003, **490**: 3
[28] wold S, Antti H, Lindgren F et al. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1998, **44**: 175
[29] Beck with-Hall B M, Brindle J T, Barton R H et al. Analyst. 2002, **127**: 1283
[30] Keun H C, Ebbles T M D, Antti H et al. *Anal. Chim. Acta.* 2003, **490**: 265
[31] Griffin J L. *FEBS Lett.* 2002, **530**: 109
[32] Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn W B, *Trends Biotechnol.* 2004, **5**: 246

第 13 章　生物信息学

在生命科学研究中所产生的海量信息如何进行储存、检索和分析已经成为当今自然科学必须解决的重大问题，在这样的背景下，产生了一门新兴的交叉学科——生物信息学(bioinformatics)。目前，它已广泛地渗透到生命科学的各个研究领域中，成为生物、医学及相关学科发展不可缺少的重要工具。随着人类基因组计划的快速发展和蛋白质组学研究的兴起，生物信息学技术在人类疾病与功能基因的发现与识别、基因与蛋白质的表达与功能研究方面都发挥着关键的作用，在基于基因与蛋白质功能缺陷的合理化药物设计方面也有着巨大的潜力。

13.1　生物信息学的概念

生物信息学是综合运用计算机科学、数学和生物学的各种工具，对生物信息进行获取、处理、存储、分发、分析和解释等处理的科学。其研究内容包括了序列和结构比对、蛋白质结构预测、基因识别、分子进化分析、比较基因组学、序列重叠群、药物设计、基因表达谱等方面。具体地说，生物信息学是把基因组 DNA 序列信息分析作为源头，找到基因组序列中代表蛋白质和 RNA 基因的编码区；同时，阐明基因组中大量存在的非编码区的信息实质，破译隐藏在 DNA 序列中的遗传语言规律；并在此基础上，归纳、整理与基因组遗传信息释放及其调控相关的转录谱和蛋白质谱的数据，从而认识代谢、发育、分化、进化的规律。其研究工具是能够上网的各种计算机及相应的生物学专业软件。因此，可以把现阶段生物信息学的基本特征概括为“分子生物学与信息技术的有机结合体”。生物信息学的最大特点就是信息搜索和处理的自动化、网络化，任何一台可以与互联网对接的计算机都可以作为生物信息获取和处理的用户终端工具。

13.2　重要的生物信息学数据库

生物信息学数据库是长期存放在计算机内的、有组织的、可共享的表明了一些事实性的信息的数据集合。而数据库系统则是一个可实际运行的存储、维护和应用系统，是提供数据的软件系统，是存储介质、处理对象和管理系统的集合体。

13.2.1　生物信息学数据库的结构

生物信息学在对已有知识的总结与提炼过程中，形成了原始数据库、数据分析算法以及专门的计算机软件。广义的生物信息学数据库主要分为两大类：基本数据库和二级数据库。基本数据库主要包括原始数据，例如 DNA 序列、蛋白质序列和蛋白质结构等信息。二级数据库则主要是对基本数据库进行分析、提炼、加工后而形成，旨在使得基本数据库更便于全世界研究人员（用户）使用，例如，真核生物启动子数据库（eukaryotic promoter database，EPD）、蛋白质序列中的共同结构和功能基序数据库（PROSIT databas）等。

一个典型的数据库记录通常包括两部分内容：原始（序列）数据和对这些数据进行的生物学意义的注释。这些注释和原始（序列）数据具有同等重要性。随着人类基因组计划的完成和其他重要模式生物基因组的全序列测定工作的不断推进，已获得了海量的基因组序列数据，然而对这些数据进行生物学功能的注释和解析却远远落后于测序，因此，如何开发新的软件对现有的人基因组数据和模式生物基因组数据进行准确高效地注释已成为生物信息学研究的重点之一。

13.2.2　数据库的基本序列格式

不同的数据库用不同的数据格式记录，因此，在生物信息学中也就出现了与各个数据库对应的多种序列的记录格式。由于 EMBL 和 GenBank 是最主要的核酸序列数据库，所以 EMBL 数据格式和 GenBank 数据格式被广为采用。欧洲国家的许多数据库如 SWISS-PROT、ENZYME、TRANSFAC 都采用与 EMBL 一致的格式，便于使用 EBI 所采用的序列检索系统（SRS）。

众所周知，生物信息数据库的建立和应用软件的设计是为了处理各种序列数据，这就要求有一套标准的格式来输入核酸和蛋白质序列信息（数据）。EMBL 和 GenBank 的数据格式比较复杂，常用的序列格式有 NBRF/PIR、FASTA 和 GDE 3 种，尤其是 FASTA 格式的使用最广泛。现以大肠杆菌克隆载体 pUC19 为例说明 3 种序列格式的特点（为节省篇幅，只列出 1～120 核苷酸序列）：

（A）NBRF/PIR 格式

```
>N1;pUC19_ECOLI
E. coli clone vector:L09137
        tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca
          cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg
          *
```

（B）FASTA 格式

```
>pUC19_ ECOLI L09137/E. coli clone vector
        tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca
```

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg

(C) GDE 格式

%pUC19_ ECOLI L09137/*E. coli* clone vector

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg

NBRF/PIR 的格式特征是第一行(标题行)以“>N1;”开始,表示是核酸序列。若是蛋白质序列,则以“P1;”开始。分号后紧跟一个编号,是该序列的唯一编号,pUC19_ECOLI 是该序列的唯一标识号,表示来源于大肠杆菌。后面的一行是说明行,可长可短,也可以空缺。接下来是序列本身,序列末尾以星号(*)终止。这类文件的扩展名为“.pir” 或“.seq”。

FASTA 格式又称 Pearson 格式。该序列格式要求序列的第一行(标题行)以“>”开头,但没有指明是核酸还是蛋白质序列。后紧跟序列编码,接着是说明,都在同一行,通常说明要以“/”隔开,第一行也没有长度限制。下起一行为具体的序列。注意,序列末尾没有任何符号标志。这种文件的扩展名为“.fasta”。如果一次要输入多条核酸和蛋白质序列,只要将这些序列的 FASTA 格式连续列出就行了,应用十分方便。在联网进行数据分析时,大部分程序对 FASTA 格式序列中的非指定字符(如数字、空格等)会自动过滤掉。

GDE 格式与 FASTA 格式基本相同,区别在于行首以“%”开始,而不是 FASTA 的“>”,这类文件的扩展名为“.gde”。无论哪种格式,一般建议序列行的每行字符数不超过 60 或 80 个,以方便程序处理。

FASATA 文件的首行和 NBRF/PIR 文件的第二行如果很长,在行内绝对不能插入换行回车符,否则,在注释内容时计算机程序可能会把它当作序列的一部分进行注释。

13.2.3 基本的 DNA 数据库

核酸(DNA、RNA)序列数据是各种生物信息数据中最重要的组成部分。目前最主要三大权威核酸序列数据库由国际核酸序列数据库合作项目(International Nucleotide Sequence Database Collaboration)协调和领导。这 3 大数据库是:美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)的 GenBank 数据库、欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute,EBI)维护的EMBL 数据库和日本国立遗传学研究所(Japan National Institute of Genetics Center for Information Biology)的 DDBJ(DNA data bank of Japan)数据库。这三大数据库虽然具有各自不同的数据记录格式,但是对于核酸序列均采用了相同的记录标准,同时每天都互相交换数据以达到数据的更新和一致。用户可以向其中任意一个数据库提交序列,所提交的序列将从公布之日起同时在该三大数据库中出现。

1. GenBank 数据库

GenBank 是由美国国立卫生研究院(NIH)的 NCBI 维护的 DNA 和 RNA 序列数据库(http://www.ncbi.nlm.nib.gov/Genbank/),是当今世界上最权威最广泛的核酸序列数据库。GenBank 数据库每天更新。其中所收录的序列包括基因组 DNA 序列、cDNA 序列、EST 序列、STS 序列、载体序列、人工合成序列及 HTG 序列等。通过它不仅可以查询到所需要的序列,而且还可找到与之同源的基因组 DNA 序列、cDNA 序列、EST 序列、STS 序列以及专利序列等。与 GenBank链接的重要数据库有 PubMed、PDB 以及种属分类库等。具体的查询方式可根据用户的研究目的,通过 NCBI 的 Entrez 搜索引擎进行(http://www.nbbi.nlm.nih.gov/Entrez)可查询的内容有系统分类、基因组、图谱、蛋白质结构等信息;序列同源性检索可用 NCBI 提供的 BLAST 工具(软件)进行;此外,Genbank 中还有 SNP、EST、STS、GSS、HTG 和 HTC 等子库供用户检索。每种搜索方式又可以通过关键词、作者、GenBank 接受号、种属分类等进行查询。需要注意的是使用 Entrez 搜索可获得比只在 Genbank 中搜索得到的更多的数据(图 13.1)。研究者获得的序列等数据也可通过 NCBI 的 BankIt 或 Sequin 软件按照提示向数据库提交。

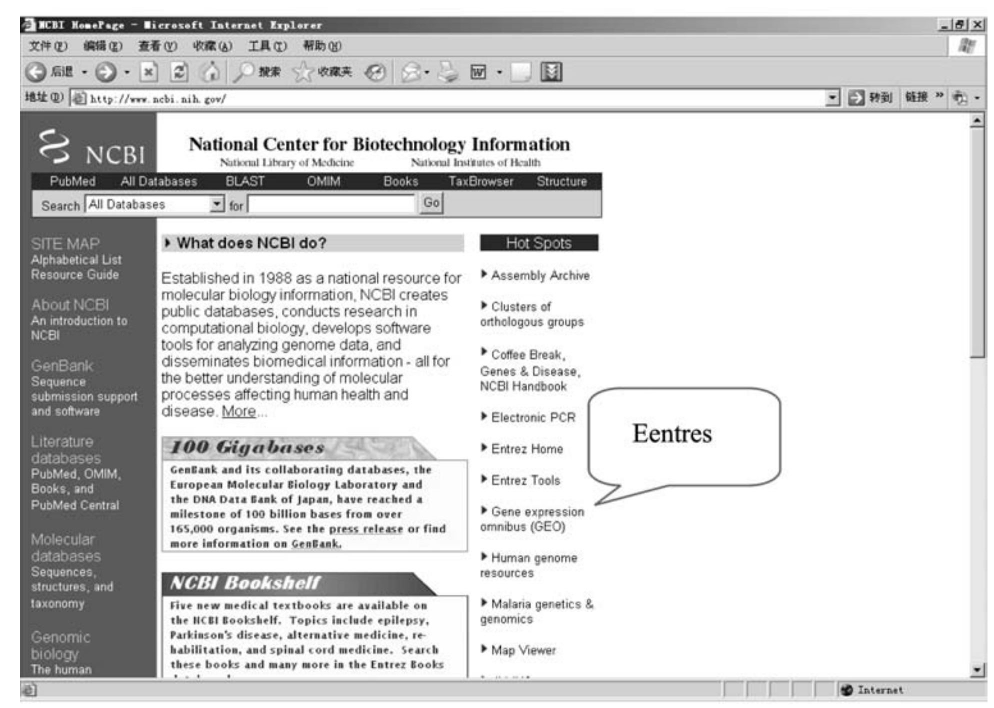


图 13.1　NCBI 主页

2. EMBL 数据库

EMBL 数据库是欧洲分子生物学实验室(英国)的 DNA 和 RNA 序列数据库。其显著特征是可为申请者提供一个通过网络的个人基因组申请工具,使申请者与全世界重要相关网站和欧洲专利局数据进行对比,确定自己的发现是否为第一个发现。也可以提供科学文献、序列比对等方面的查询。该数据库每日更新。

EMBL 主页(http://www.ebj.ac.uk/embl)界面主要包括 Access、Documentation、Submission、Group Info、Contact 和 News 几个项目供用户选择使用。Access界面(图 13.2)可以为用户提供多种选择的数据库查询方式,如 Genomes、SRS、CDSEST、STS 等。

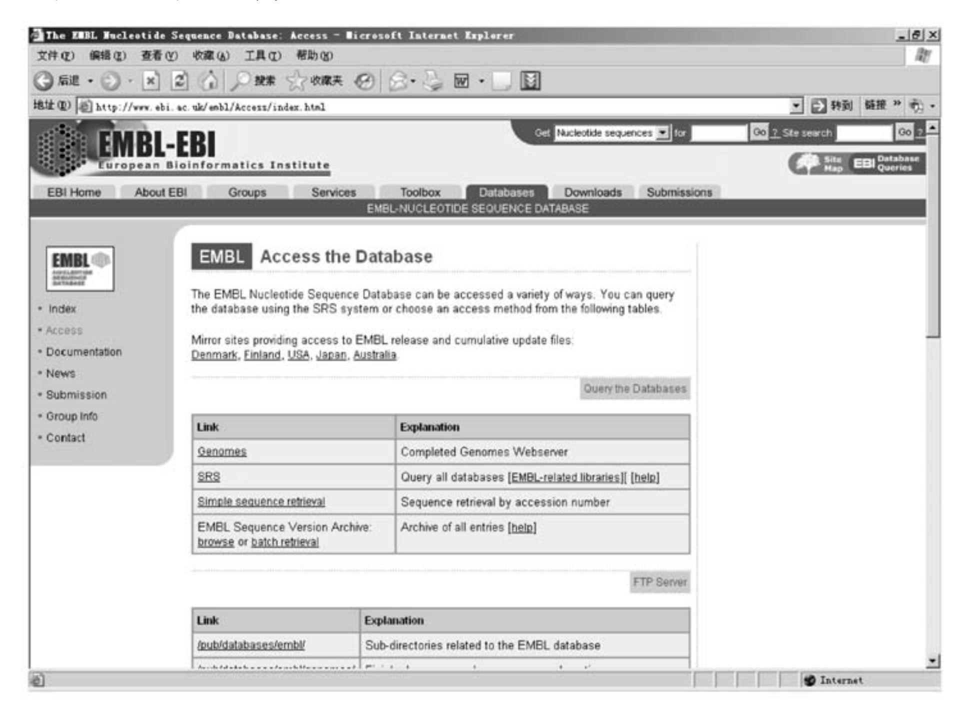


图 13.2　Access 界面

Documentation 主要包括申请信息、常见问题、最新信息、数据库统计和录入样本等。

EMBL 数据库与 EBI 主页相连接,通过该页面,用户可以进入 EBI 的其他资源,如 toolbox。这是一个非常有用的软件工具,用户可以用该软件做一系列生物信息查询、生物信息学分析等工作。

EMBL 数据库有一个独特的优点,即基因的蛋白质翻译序列一旦被 EMBL 收

录，就会被自动被添加到 TrEMBL 蛋白质数据库中。而 SWISS-PROT 数据库的管理员会从中提出数据组成 SWISS-PROT 数据库，使 EMBL 的核酸数据库和 SWISS-PROT 交叉。此外，该数据库还和 TRANSFAC、FLYBASE、IGMT 等交叉，进一步扩大了信息的完整性（老用户注意：从 2006 年 1 月 16 日起，该数据库取消了使用很久的 Flat file 格式。）

3. DDBJ 数据库

DDBJ 数据库是由日本国立遗传学研究所遗传信息中心维护的日本核酸数据库（http://www.ddbj. nig.ac.jp）。它首先反映日本基因组测序所产生的 DNA 数据，同时与 GenBank、EMBL 合作（图 13.3），交换数据，同步更新。该数据库采用与 GenBank 一致的记录格式。



图 13.3　DDBJ 主页

DDBJ 同样具有强大的检索功能，如 SRS、ARSA、FASTA、BLAST 和 GIB 等。尤其是 GIB（genome information broker），能不断地收录和补充陆续完成的全基因组测序的物种的全基因组数据供用户查询。目前，GIB 已收录了 298 种生物的全基因组序列。

为了收集和发布人类基因组计划,产生的完整人类基因组数据,DDBJ 还建立了 HGS 数据库,主要任务是收集和整理所有序列数据改建人染色体,并将所有已知基因定位在染色体上。编辑人类基因目录。及时更新和补充数据库。

DDBJ 在序列提交上也有过人之处,它开发了一种称为 MMS(mass submission system)的数据提交系统,它的提交工具 MST 可以将数据整理成一种可随时提交的形式,而且可以当作一个数据产生站点的分析器使用。这个分析器可以检测一些微小的错误,保证提交数据的准确无误。EMBL、GenBank 和 DDBJ 三大数据库序列格式的注解见表 13.1。

表 13.1　三大数据库序列格式的注解

EMBL	GenBank	DDBJ	注解
	LOCUS	LOCUS	序列名称及类型
AC	ACCESSION	ACCESSION	接受号
DT			提交日期
DE	DEFINITION	DEFINITION	描述
KW	KEYWORDS	KEYWORDS	关键词
OS	SOURCE ORGANISM	SOURCE ORGANISM	种属
OC			种属纷类
OG			细胞器
RN	REFERENCE	REFERENCE	参考文献编号
RC			参考文献评论
RP			参考文献位置
RX			参考文献互引
RA	AUTHORS	AUTHORS	参考文献作者
RT	TITLE	TITLE	参考文献题目
RL	EMBL	JOURNAL	参考文献出处
DR	ID	COMMENTS	数据库间交互索引
	MEDLINE	MEDLINE	参考文献 Medline 编号
FH	FEATURES	FEATURES	特征标题(位序列置/限定语)
FT	FEATURES	FEATURES	序列性质数据
FT 5′UTR	5′UTR	5′UTR	5′非编码区
3′UTR	3′UTR	3′UTR	3′非编码区
CDS	CDS	CDS	编码序列(区)
CC	COMMENT	COMMENT	评述
XX			字段分界标志
SQ			EMBL 序列开始标志
	BASE COUNT	BASE COUNT	GenBank/DDBJ 碱基数目
	ORIGIN	ORIGIN	GenBank/DDBJ 序列开始标志
blank			序列数据
//	//	//	纪录终止标志

4. BioSino 数据库

Biosino 数据库是我国自主开发的核酸序列公共数据库(http://www.biosino.orgl),由中国科学院上海生命科学研究院生物信息中心维护。该数据库主要收集中国科研人员递交的核酸序列,为用户提供核酸序列数据存储、序列检索、序列格式转换、序列比较等服务,同时通过本数据库可以对中国国内各课题组递交的核酸序列进行统计和比较,为了解国内核酸序列情况提供依据,并可与 GenBank、EMBL、DDBJ 数据库进行格式转换。包括中国核酸序列数据库和中国人核酸序列统计数据库,目前该数据库共有二千七百多万条记录。

从该数据库还可以进入 DDIB(database of domain interactions and binding)数据库,该数据库收集了结构域与结构域间的相互作用、结构域与生物分子如 RNA、DNA、多肽及小分子之间的相互作用数据。此外,该数据库还包含了许多从文献报道的蛋白质相互作用中推测出的共认的相互作用的结构域。

13.2.4　基本蛋白质数据库

目前常用的蛋白质序列数据库主要有 SWISS-PROT 数据库和 PIR 数据库。该两大蛋白质序列数据库是随同 EMBL 和 GenBank 的增长一起发展的。

1. SWISS-PROT/TrEMBL 数据库

SWISS-PROT(http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html)是含有详细注释内容的蛋白质序列数据库,1987 年由日内瓦大学医学生物化学系(Department of Medical Biochemistry of the University of Geneva)与 EMBL(欧洲分子生物学实验室)共同维护,现在由 EMBL 的分支机构 EBI 进行维护,为分子生物学研究人员提供有关蛋白质氨基酸序列的最新信息。SWISS-PROT 数据库包含了 EMBL 核酸序列数据库中被经过仔细检查和准确注释了的蛋白质序列。一般地说,任何蛋白质序列数据的搜寻和比较都应从 SWISS-PROT 开始。

SWISS-PROT 蛋白质序列数据库由大量序列条目组成,每一个序列条目有其自己的格式。为了标准化的目的,SWISS-PROT 的格式与 EMBL 核酸序列数据库的格式应尽可能类似。SWISS-PROT 涉及已知蛋白质的功能、序列(包括一些蛋白质片段的序列)、结构域(如跨膜区等)的结构、翻译后修饰(如磷酸化与去磷酸化等)及其位点、突变体等,目前已经收录了 20 多万个非冗余序列。通过它可以查询所需蛋白质的上述所有内容,从而指导进一步的实验。SWISS-PROT 可通过关键词、SWISS-PROT 接受号、作者等进行查询。SWISS-PROT 还与其他一些数据库相链接,包括 PROSITE、SWISS-2DPAGE、SWISS-3D IMAGE、NCBI 的数据库等,因而可进行更为广泛的查询工作。

TrEMBL 是对 SWISS-PROT 的补充，EMBL 中将没集成进 SWISS-PROT 数据库的所有序列都经过计算机进行蛋白质翻译（注释）形成另一个与 SWISS-PROT 对应的数据库 TrEMBL。目前，SWISS-PROT/TrEMBL 和 PIR 数据库已经联合起来组成了 Universal Protein Knowledgebase（UniProt）联盟。

2. PIR 数据库

PIR 数据库（http://pir.georgetown.edu/）即蛋白质信息资源数据库（protein information resource，PIR）最初是由美国国家生物医学研究基金会（National Bio-medical Research Foundation，NBRF）支持创建。其后，PIR 与德国慕尼黑蛋白质序列信息中心（Martinsrie Institute for Protein Sequences，MIPS）和日本国际蛋白质序列数据库（Japanese International Protein Information Database，JIPID）合作，共同创立和维护了世界上最大最全的蛋白质信息公共数据库（图 13.4）。该数据库包括的子库有：PIRSF（蛋白质家族分类系统）、PSD（蛋白质序列的注解与分类）、ProClass（超家族和主题序列的非冗余数据）和 PIR-NREF（非冗余的氨基酸序列）。其主要目的是为用户提供按同源性和分类学组织的综合性、非冗余数据库。为达到“全面、及时、非冗余性、高质量注释和全面分类”的目标，该数据库每周更新，每年发行四版。

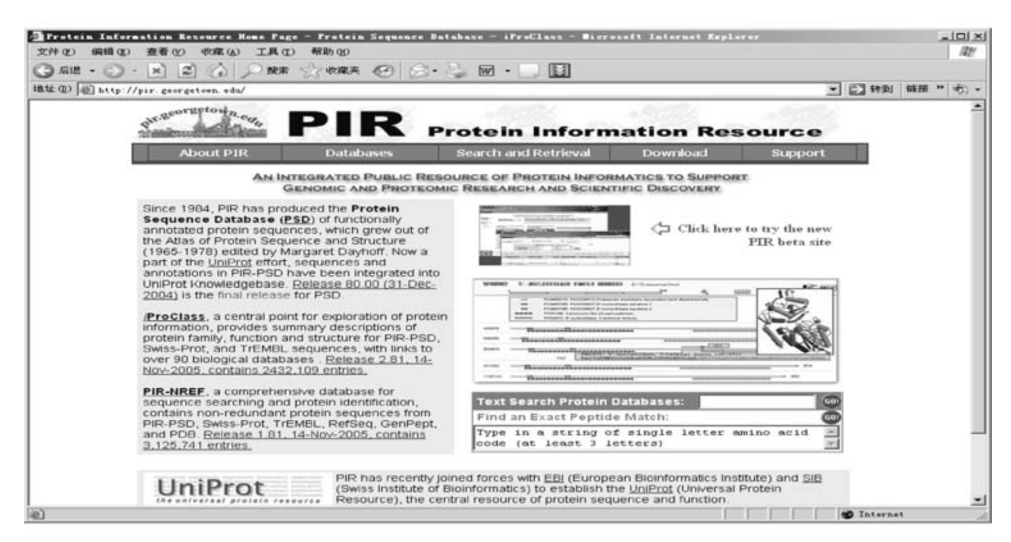


图 13.4 PIR 主页

PIR 数据库按照数据的性质和注释的层次分为 4 个不同的部分，即 PIR1～PIR4：PIR1 包括的序列已经被分类和注释；PIR2 包含序列初步的信息，这些信息还没有被完全检验，可能含有一些重复的信息，即冗余序列；PIR3 包含一些未被验证的条目；PIR4 中的信息又分成 4 类：①人工合成序列的概念上的翻译（conceptual translation）；②没有转录或翻译的序列的概念上的翻译；③蛋白质序列或

基因工程序列的概念翻译；④没有基因编码和没有生成核糖体的序列。

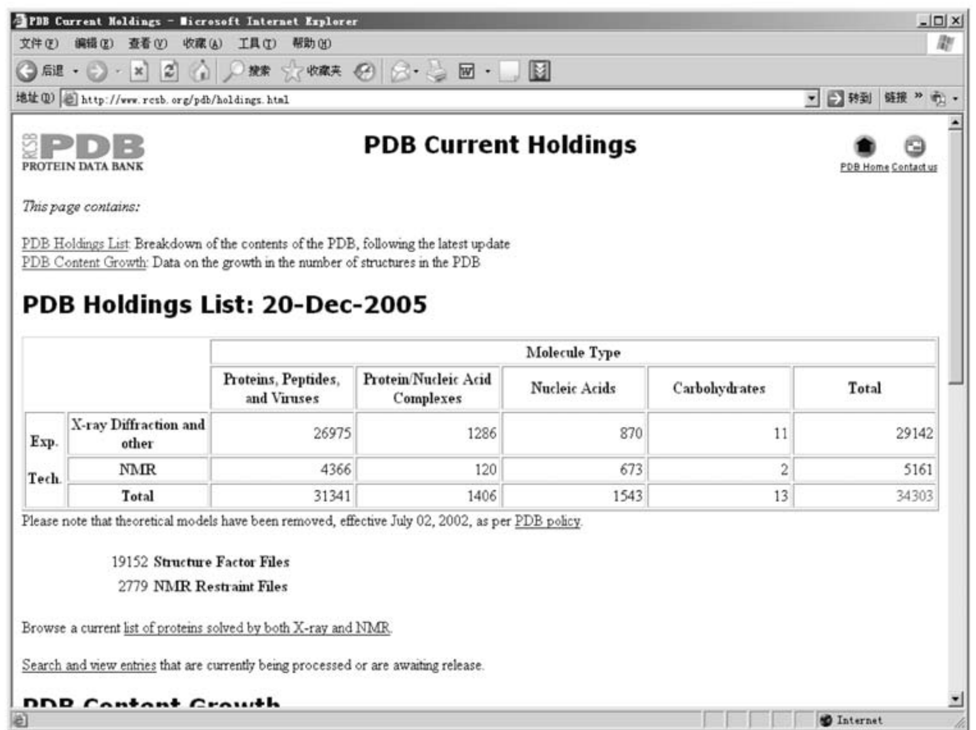
PIR 数据库是唯一在数据库的条目中提供交叉参考的数据库，使用户可以对目的蛋白质与其他分子如亚单位、反应底物、生化反应、激活因子及调控因子之间的各种复杂关系进行查询，加深对目的蛋白质的认识。

PIR 数据库网页上提供了数据搜索和序列查找的程序，用户通过 PIR 可以进行的研究包括：①快速查询、比较蛋白质序列并对其进行特征序列的模式匹配；②预测蛋白质的功能位点，如磷酸化位点、糖基化位点、细胞吸附位点、与其他蛋白质的共有序列等；③可进行多种方式的序列比较，如对库比较、两两比较和多序列比较等。用户可通过关键词、特征序列或序列接受号等进行查询。

13.2.5　蛋白质结构数据库

将通过实验研究如基于 X 射线衍射和核磁共振分析所获得的关于蛋白质、酶、病毒、碳水化合物和核酸的晶体结构数据收集起来，就形成了生物大分子的结构数据库。虽然其中序列的数量远比不上蛋白质序列数据库，但也在呈指数增加。

蛋白质数据库(protein databank，PDB)是全球唯一的储存、处理和发布蛋白质和核酸大分子 3-D 结构的数据库(图 13.5)。它主要由 X 射线晶体衍射和核磁



		Molecule Type				
		Proteins, Peptides, and Viruses	Protein/Nucleic Acid Complexes	Nucleic Acids	Carbohydrates	Total
Exp. Tech.	X-ray Diffraction and other	26975	1286	870	11	29142
	NMR	4366	120	673	2	5161
	Total	31341	1406	1543	13	34303

图 13.5　PDB 数据库大分子结构统计

共振测得的生物大分子的三维结构所组成，用户可直接查询、调用和观察库中所收录的任何大分子三维结构，网址为 http://www.rcsb.org/pdb/。该数据库同时提供蛋白质序列及其三维空间晶体学原子坐标，其中受体一配体、抗原一抗体、底物一酶复合物等相互作用分子的共结晶图谱是基于同源比较的分子设计所需的最佳模型，因此 PDB 数据库为初步的蛋白质合理设计提供了重要的知识来源。由于 PDB 主要由生物大分子三维结构所组成，所以优势在于蛋白质结构预测和结构同源性比较。它提供以下几种服务：①查找目的蛋白质的结构；②进行一级或高级结构的简单分析；③与其他的数据库（如 GDB、GenBank、SWISS-PROT、PIR 等）链接，查询蛋白质的其他信息等。

13.3 搜索引擎——ExPASy

ExPASy 是蛋白质分析专家系统（Expert Protein Analysis System）的缩写。ExPASy（http://www.expasy.ch/）是一个数据库的集合，专注于蛋白质分子和蛋白质组学。ExPASy 已经启动的一项主要的工程是根据 Swiss-Prot 的质量标准注释所有已知的人类的蛋白质序列。这意味着对于每一个已知的蛋白质，都有包括了它的功能、结构域、亚细胞定位、转录后修饰、可变体、与其他蛋白质的相似性等的描述。

与所有的生物信息学网站一样，ExPASy 也由两大板块组成：数据库和应用工具（软件）（图 13.6）。ExPASy 的数据库主要有：Swiss-Prot 和 TrEMBL、PROSITE、ENZYME、SWISS-2DPAGE、SWISS-MODEL Repository 等。ExPASy 的工具（程序）主要有：proteomics and sequence analysis tools、MSight（mass spectrometry imager）、ImageMaster/Malanie（software for 2-D PAGE analysis）和 roche applied science's biochemical pathways 等。

1）PROSITE

PROSITE 是关于蛋白质序列基序（motif）检索的数据库。基序亦称序列模体（motif），通常指蛋白质序列中相邻或相近的一组具有保守性的残基，与蛋白质分子及其家族的功能有关。PROSITE 数据库的主要目标在于收集和整理已经明确功能的序列基序，所以在进行具体查询时必然会出现一些较多的假阳性结果，尤其是对那些较小的氨基酸序列。而当查询一些较为复杂的序列基序时，则往往会因为一个氨基酸的不匹配而导致该序列基序不能被成功地检出。因此，PROSITE 数据库是一个不完美的数据库。但是，它包括了酶活性位点、辅助因子结合位点、二硫键 S—S 位点等重要的蛋白质结构信息，对预测蛋白质的功能有明显的帮助，可帮助研究者确定新的目的蛋白质序列是否属于已知的蛋白质家族。

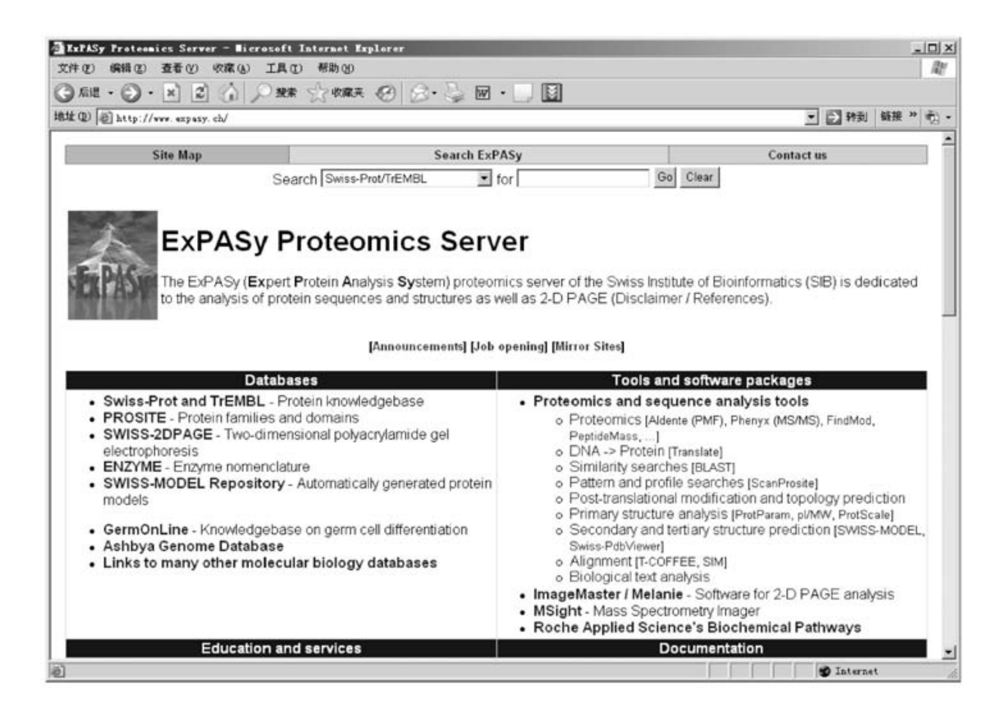


图 13.6　ExPASy 主页

2）SWISS-2DPAGE

SWISS-2DPAGE 建立于 1993 年，是由双向聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴别的蛋白质数据库，数据来源于很多不同的样本，例如人、鼠、枯草杆菌、大肠杆菌、酵母等，包含了 2-D PAGE 和 SDS-PAGE 上鉴定出的蛋白质数据的参考图谱。2-D PAGE 是关于 2-D PAGE 的信息收集，包括对实验原型的详细描述，并提供了一个 2-D PAGE 浏览器下载。每一条 SWISS-2DPAGE 记录都包括对一个蛋白质的文字性描述的数据资料，如图谱的操作程序、生理病理信息、实验数据（如等电点、相对分子质量、氨基酸组成、肽质谱等）和参考文献。同时，SWISS-2DPAGE 还提供若干显示实验确定的蛋白质位置及从蛋白质序列中通过计算机预测位置的 2-D PAGE 和 SDS-PAGE 图谱。而 world 2-D PAGE 是所有已知的二维凝胶电泳网络数据库服务器的列表及其相关的服务。具体细节请读者自己进入该网站做进一步的了解。

3）SWISS-Model

SWISS-Model 是蛋白质分子模建服务系统（molecular modeling server），采用一系列工作软件，从经典的布鲁克海文蛋白质结构数据库（brookhaven PDB）中提

取蛋白质查询序列的模拟结构信息，用具有蛋白质相似性的已知结构蛋白建立未知结构蛋白的分子模型。目前 SWISS-Model 不仅能够产生一系列蛋白分子模型，而且还与 SWISS-2DPAGE 等数据库建立了数据库整合连接，扩大了服务系统的功能。目前收集的 3D 模型有 67 万多个。用户只要提交一未知结构 FASTA 格式序列（拟进行分子模建），服务系统将运用 FASTA、BLAST、SIM 和 CompAli 方法对晶体结构库序列进行相似性序列分析（sequence alignment）。如果可行，ProMod 程序将建立分子的原子组成模型。也可以将序列相似性序阵文件（alignment file）及一命令文件（command file）提交给 ProMod，随意改变 SWISS-Model 推荐的序阵或减少模板结构数，取得更合适效果，进行优化模式建模。注意，SWISS-Model 模型是由计算机计算产生的，可能存在重大的错误，用户在实际使用中应当注意。

蛋白质分子模建在设计突变实验、设计新药等分子生物学领域，有不可缺少的指导作用，提供了十分必要的参考信息。虽然目前已知结构蛋白尚不够多，分子模建的实验基础数据有待充实，模建方法有待完善，但分子模建发展仍然十分迅速，有着非常广阔的发展前景和不可估量的指导作用。

4）SWISS-Model repository

SWISS-Model repository，即蛋白质分子模型储存数据库，为自动生成的蛋白质分子模型数据库。根据用户输入的基因、蛋白质名称，或者相关描述可以查询蛋白质的模型结构。SWISS-Model 与 Swiss-Prot 和 Interpro 整合，用户也可以通过输入这两个数据库的蛋白质登录号查询相关的蛋白质结构。

5）Proteomics and sequence analysis tools

Proteomics and sequence analysis tools 是 ExPASy 数据库中重要的蛋白质组学研究工具，包含了许多实用工具，如：①ScanProsite：提供 SwissProt/TrEMBL 和 Prosite 之间的相互查询，用户输入 SwissProt/TrEMBL、蛋白质的登录号或者 ID 标识符、PDB 标识符，或直接将自己的蛋白质序列粘贴到文本框中，ScanProsite 将扫描整个 PROSITE，并提供所有匹配的结果。此外如用户输入 Prosite 的蛋白质登录号，ScanProsite 也会在 SwissProt/TrEMBL 进行扫描，提供相关的数据。②AACompIdent：可以通过蛋白质的氨基酸成分来鉴别一个蛋白质。③AACompSim：通过给定一个 SWISS-PROT 的序列，查询得到有最高的相似度的序列；④Compute PI/MW：计算用户输入的序列或者 SWISS-PROT 或者 TrEMBL 数据库中序列的等电点和相对分子质量；⑤FindMod：预测潜在的蛋白质翻译后修饰和蛋白质中潜在的单氨基酸替换；⑥FindPept：综合相对分子质量的信息、化学修饰、翻译后修饰等其他信息共同来鉴定蛋白质；⑦GlycanMass：计算

寡糖(oligosaccharide)结构的质量(mass);⑧ GlycoMod:预测可能的寡糖结构;⑨PeptideCutter:预测给定蛋白质的蛋白酶剪切位点和化学剪切位点;⑩ PepIndent、TagIndent 和 MultiIndent:使用很多不同的实验信息来鉴定一个蛋白质,例如等电点、相对分子质量、氨基酸组成、部分序列标记和肽的质谱数据(peptide mass finger-printing data)。

6) Msight

Msight(mass spectrometry imager)是蛋白质 2D 电泳后质谱数据分析软件(图 13.7)。

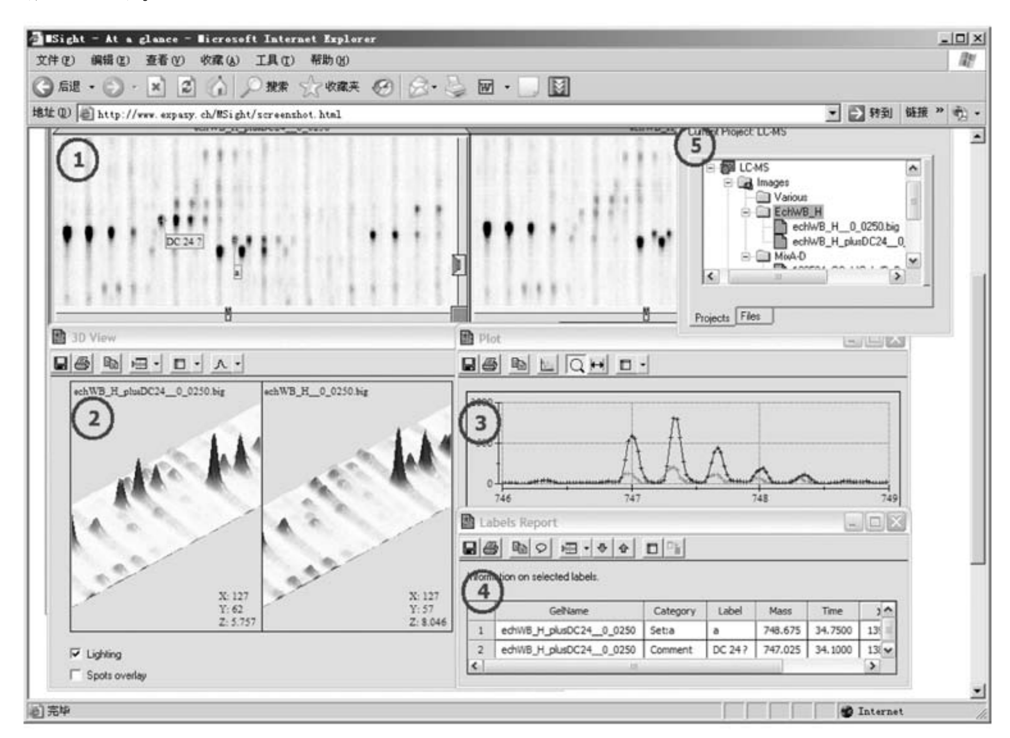


图 13.7　2D-PAGE 的质谱分析结果

7) ImageMaster

ImageMaster/Malanie(software for 2-D PAGE analysis)是观察比较蛋白质二维凝胶图像的服务软件。Malanie 是最早的软件,后来由 SIB、GeneBio 和 Amersham Biosciences 共同开发了 Amersham Biosciences ImageMaster™ 2D Platinum 软件。ImageMaster 2D Platinum 是一个完备的、艺术级的软件,用于分析双

向电泳(2-DE)凝胶。此版本的 ImageMaster 是由来自瑞士生物信息学研究所(SIB)的顶级研究人员组成的一个团队与日内瓦生物信息学(GeneBio)S.A.合作,并整合 Melanie 软件而开发出来的。它是在与来自日内瓦 Hochstrasser 教授团队的生物学家和蛋白质组学科学家的紧密合作下构思的,并在世界范围的许多用户的帮助下被进一步改进,从而确保快速和可靠的凝胶比较。ImageMaster 2D Platinum 易于管理多项的凝胶分析,并且可选择自动的、半自动的、或者手动的检测蛋白点和匹配模式,因而允许在任何时候进行对结果的交互式调整和微调。

ImageMaster 中的极端灵活和全能的工具使此软件可根据特定要求而行动和反应,而高度自动的和先进的分析技术增强了从双向电泳凝胶产生的数据的定性和定量检查。它能够通过使用直觉的定量过滤器和搜索选项选取部分数据,并且结果可以简单地通过浏览比较的表格或图形报告中的数据、或者在凝胶和报告之间导航而被查看。更高水平的比较和分析能够在从实验凝胶产生的平均化或总图像上实现。

ImageMaster 的突出特点是:①增强的蛋白点检定、凝胶排列和凝胶匹配运算法则;②在工作区中的数据的有效使用和组织;③所有数据类型(凝胶、报告等)的易访问性、简单的询问性;④分析过程自动化、或者使用脚本的部分过程的自动化;⑤使用多水平的撤销/重做而增强的安全性;⑥使用历史功能而更好的控制和保证质量;⑦蛋白点、凝胶和报告的单一的标识符;⑧将蛋白点的坐标输出到自动斑点切取系统,并与外部数据源或搜索引擎链接;⑨易于观看凝胶之间蛋白质表达差异的双通道显示;⑩有助于决定蛋白点编辑的蛋白点峰形图和三维视图。图 13.7 是该软件处理的一张 2-D PAGE 图。

8) DeepView

DeepView(Swiss-Pdbviewer)是一个可以在 Windows、Mac OS、SGI 和 Linux 多平台下运行的程序,提供了很多的选项用于观察和操纵蛋白质结构,也可以用作基于 web 的服务程序,用来显示 PDB 格式的序列。Swiss-Pdbviewer 可以作为 SWISS-Model 同源建模工具的补充。

最近,为了应对在蛋白质组学研究中日益增加的生物信息学需求,ExPASy 数据库又增加了 e-proxemis(即针对蛋白质组学的生物信息学训练门户),以帮助生命科学研究者在网络环境下掌握和熟悉蛋白质组学研究中所需的生物信息学技能。

此外,ExPASy 数据库还有将 DNA 序列转为蛋白质序列的软件和二级结构分析软件等许多应用软件,这里不再一一赘述。

13.4 DNA 序列分析应用举例

13.4.1 可读框(open reading frame,ORF)预测

自从人类和其他模式生物全基因组测序工作不断展开以来,从很长的核苷酸序列中寻找基因和功能元件已经成为分子生物学研究的一个热点和关键问题。生物信息学为经济而快速地挖掘序列数据中潜在的基因及其功能元件提供了强大的网络工具。目前,虽然已开发了很多用于基因组序列数据注释的计算机算法和程序,它们主要通过识别基因特征(如信号、内容和同源性)来区分该基因和周围的DNA 序列,但用计算机方法查找的基因还没有 100%是准确的。尤其是在真核生物中,因基因密度下降,基因内部结构复杂,使基因预测的复杂程度增高。原核生物基因组中,由于没有内含子,ORF 一般容易检测。

ORF 预测的规范步骤是执行 6 个 ORF 的翻译,即 DNA 序列可以按 6 种框架阅读和翻译(每条链 3 种,对应 3 种不同的起始密码子),从而识别 6 种可能的蛋白质序列中最长的 ORF。长的 ORF 往往不是偶然发生的,所以,任何 ORF 中存在 300 bp 或更长的未中断的编码序列是判断是否为一个基因的重要依据。

笔者仍然以 pUC19 序列为例说明在 NCBI/ORF finder 中进行基因预测(图 13.8)。结果发现了 14 个可能的 ORF,但满足"大于 300 bp"条件的只有 3 个ORF,经与质粒图谱比对,第 1 个 ORF 是 Amp^r 基因的编码框,第 2~3 个是 LacZ 的α-肽编码框,但方向正确的只有第 3 个 ORF。其余 ORF 均小于 300 bp,一般没有对应的蛋白质,BLAST 检索证实第 4~14 个 ORF 均无对应的已知蛋白质序列。

真核生物的 ORF 预测则要复杂得多。cDNA 是除去内含子的"纯基因"编码序列,一条全长 cDNA 序列只含有单一的 ORF,预测相对容易。已知真核生物蛋白质合成是以 Kozak"扫描模式"起始的。即在起始蛋白质合成时,40S 核糖体亚基及相关起始因子首先与 mRNA 模板近 5′末端处结合,然后向 3′末端方向滑行,发现 AUG 起始密码子后,与 60S 大亚基结合形成 80S 起始复合物。真核细胞的核糖体不会直接结合 mRNA 内部的起始密码,所以在读完第一个可读框之后并不能接下去读第二个,这是 AUG 的前后序列所决定的。Kozak 的研究发现,真核生物起始密码周围的保守序列为 A/GNNAUGG 时对蛋白质的翻译起始最合适,这就是真核生物启动子区的"Kozak 序列"。计算机在分析读码框时,Kozak 序列是唯一的重点参考特征。

对基因组测序得到的真核生物 DNA 序列而言,由于有内含子的干扰,能否正确预测出真正的外显子是评价一个预测软件可靠性的主要依据。就目前的预测水平来说,最好的基因组 ORF 预测软件的敏感性只有 60%左右,特异性只有 50%左右[预测的外显子是真外显子(TE)还是假外显子(FE),可以通过已注释的外显

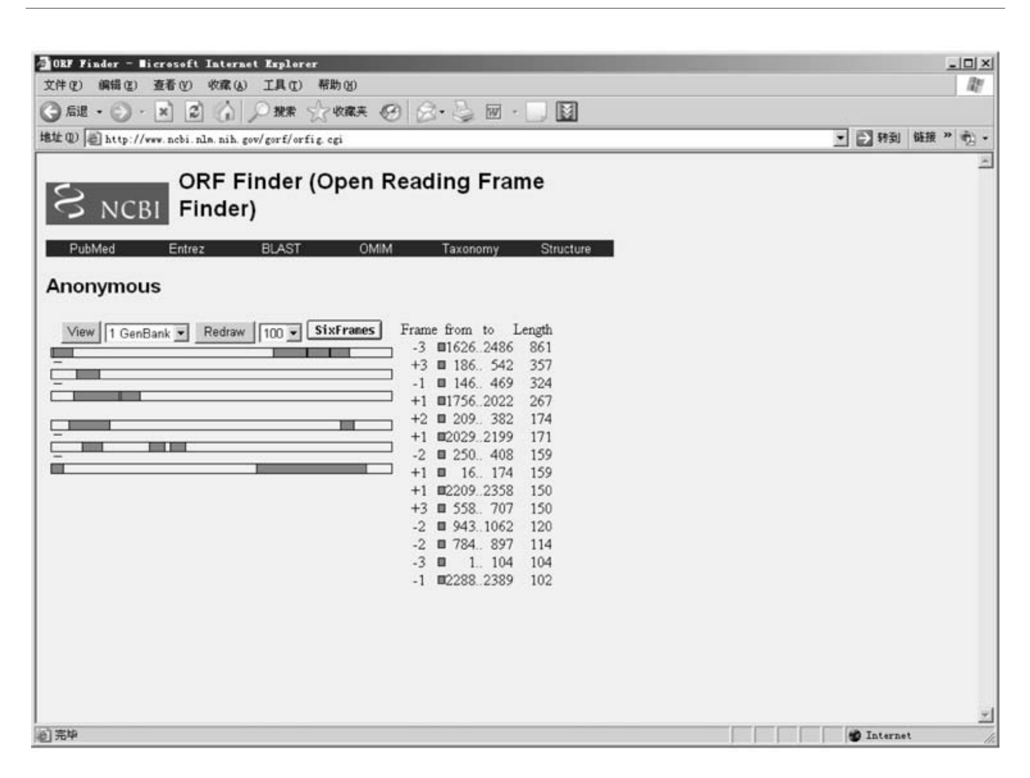


图 13.8　pUC19 序列的 ORF 预测结果

子(AE)来检测:敏感性＝TE/AE,为衡量软件正确预测外显子的能力;特异性 ＝TE/FE,为衡量软件排除假外显子的能力],因此,目前使用的每一个真核生物基因组 ORF 预测软件都要不断地进行基因预测能力的测试。所以,最好是用几个基于不同算法的预测程序来预测同一条序列,这样产生的相关预测结果的可信度较高。另外,还要注意,并非所有的预测错误都是软件造成的,例如,出现在上游的很多错误都是因为测序和序列拼接错误造成的,也有可能是数据库中已有的错误信息引起的。因此,进行基因组全长序列的编码区分析时仍然要加倍小心。

由于测序错误而导致 ORF 预测失败的错误有:相位错位或者错误的终止密码子出现可导致氨基酸序列截短,以及 cDNA 序列中出现几个不一致的 5′末端。这种错误可以通过 Blast X 程序对蛋白质序列数据库搜索进行校正。相位错位的相似性分析结果表现为在不同相位上与同一条蛋白质序列相似,而异常的终止密码子则导致在同一相位上与同一条蛋白质序列分段对齐。

采用蛋白质序列作进一步的相似性分析十分重要,这主要是由于 DNA 编码的冗余性(第三个碱基的简并性)造成的,其直接结果是即使两条 DNA 序列之间只具有 67%的相似性,在蛋白质水平就可获得 100%的相似性。因此,使用蛋白质

序列进行后续分析更能够发现有生物学意义的信息。因为,蛋白质水平之间的 25%的同源性就可提示其间功能的相似性,而在 DNA 水平则需要 40%以上的相似性。

13.4.2　DNA 相似性分析——BLASTn

生物信息学中涉及大量的分类和聚类工作。分类是根据预先设定的准则将数据分成各自独立的类别,聚类则是依据数据集本身的特性以达到归类的目的。本研究采用聚类分析(clustering analysis)的思路,使用 BLAST 软件,在数据库中查找与目的序列同源的已知序列,并推导其功能。

BLAST 分析 alignment 分析中经常会出现序列间的同源性(homology)和一致性(identity)的概念,二者有本质的区别。同源性是指从同一祖先派生(进化)出来的两个分子间的进化关系,而一致性指的是两条核苷酸或氨基酸序列中相同残基的联配分值即相似百分值。因此,同源序列一定是高度一致的,但一致序列却不一定有同源关系。为避免人为的误解,本文将把序列比对结果的相似程度一律用一致性衡量,而尽可能少地用同源性一词。

笔者仍然以 pUC19 序列中的 Amp^r 基因的编码区为例说明在 NCBI/BLAST 中进行序列比对分析。将 Amp^r 基因的编码区的核苷酸序列粘贴在 BLASTn 的文本框中,将比对范围限定在细菌(bacteria[ORG]),点击“BLAST !”按钮,再点击“FORMAT !”按钮,便出现 BLAST 的结果报告(图 13.9)。用户可以点击相应

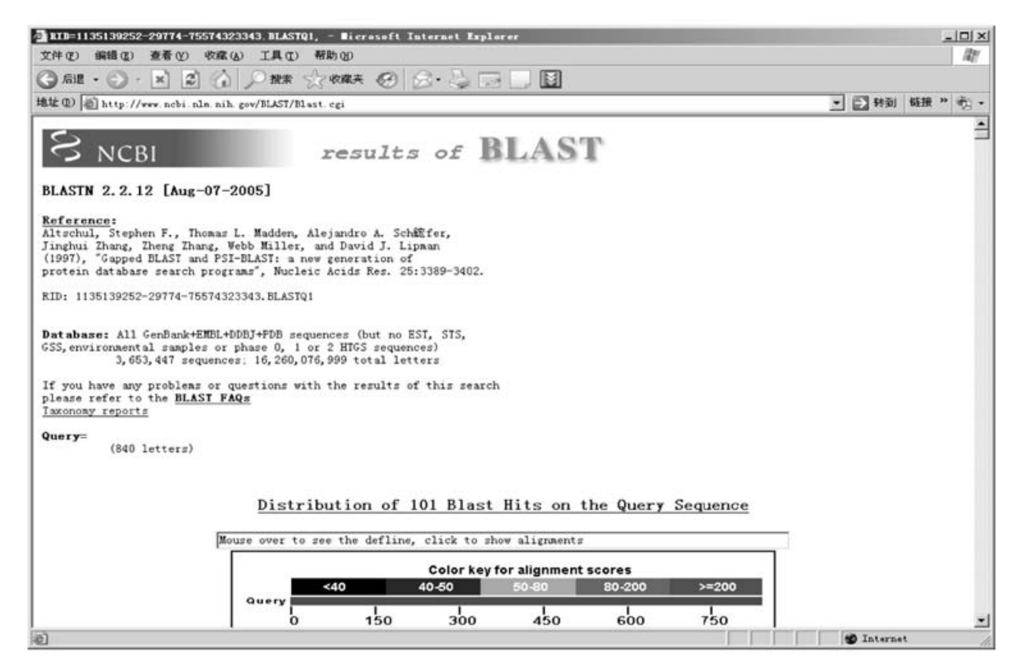


图 13.9　BLAST 结果报告

的链接,进一步了解对该序列的解释及其编码的蛋白质的功能等。

FASTA 软件也是进行核酸和蛋白质序列同源性分析的有力工具,它的运算速度比 BLAST 要慢,参数也更复杂。使用者多选择 BLAST,但 FASTA 的计算结果更准确。要详细了解 FASTA,请读者自己进入 EBI(http://www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html)练习(图 13.10)。

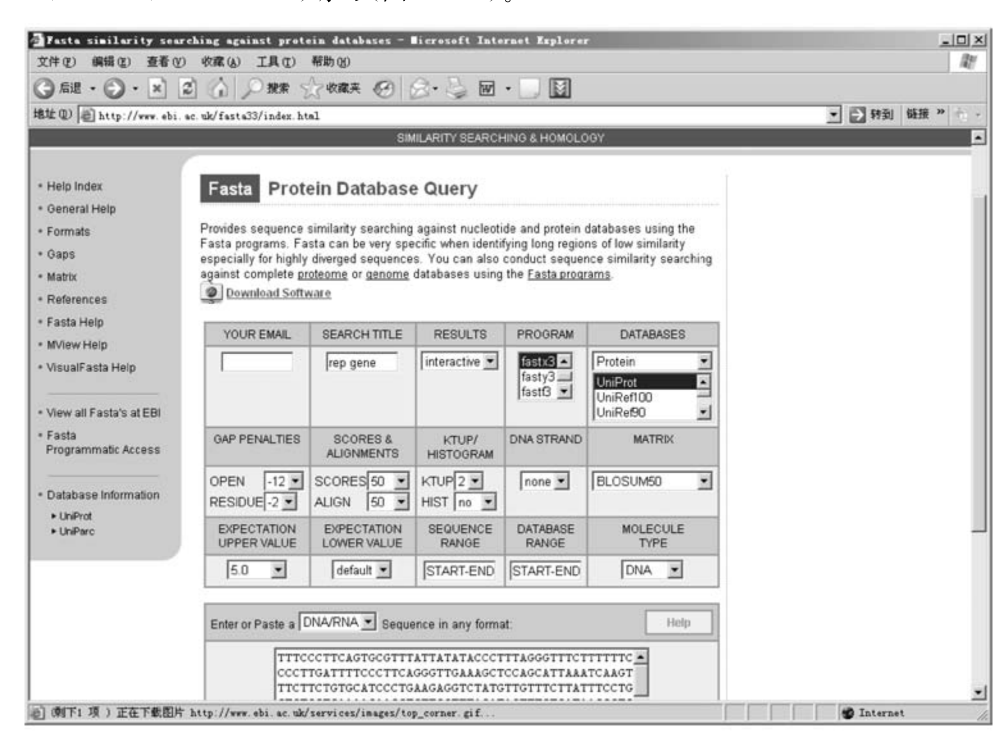


图 13.10 FASTA 界面

当 BLAST 和 FASTA 均不能发现显著性的匹配时,就需要采用其他比对策略进行分析,如 BLITZ 程序。BLITZ 运行于并行计算机上,因而运行效率较高,有时能够获得 BLAST 和 FASTA 均无法检测到的显著性匹配信息。

最后要说明的是,核酸序列的对齐情况极为复杂,由于 DNA 编码的冗余性,编码区的 DNA 序列在进行对齐之前可以先翻译为蛋白质序列进行分析。若分析的核酸序列不是编码区的时候,则很难从序列一致性的结果中得出是否有生物学意义上的显著性结论。以往的经验提示,DNA 序列具有 75%以上的同源性才可能具有潜在的生物学意义,但这种结果也很难把握,需要分析者有较丰富的经验和相关的知识储备。

13.4.3　DNA 相似性分析——Alignment

Clustal W/X 和 Megalign 是使用最广泛的多序列比对工具，大多数的生物信息学网站(如法国巴斯德研究所网站 Multalin；http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin；EBI 网站提供的 Clustal W；http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)都提供 Clustal W/X 在线比对，Megalign 是 DNAStar 软件包中的多重比对工具(http://www.dnastar.com/web/index.php)。Clustal W 的结果更漂亮和直观。图 13.11 是用 Clustal W 对新分离的一株双歧杆菌质粒 pBIF10 的转移起始位点(oriT)的序列与已知的大肠杆菌质粒的 oriT 序列进行多序列比对的结果。提示 pBIF10 的 oriT 与 IncQ 家族的 oriT 的结构不一样。

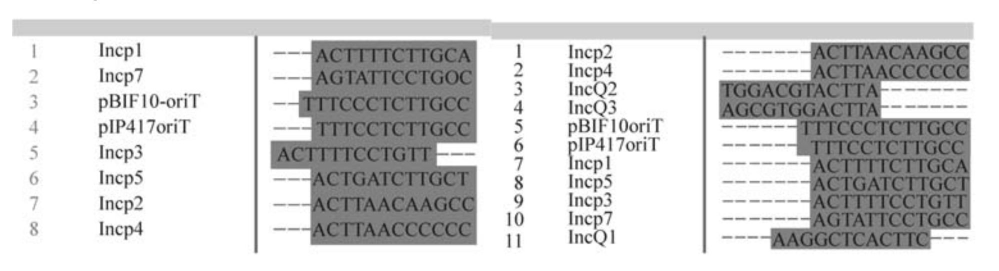


图 13.11　pBIF10 可能的 oriT 与 IncP、IncQ 已知的 oriT 之间的比对结果

值得注意的是虽然互联网上提供了众多的序列对齐分析软件，但不同的分析软件得到的结果却不一定相同，即使是同一个软件，如果使用的参数不同，也会影响到分析的结果，甚至会由于采用了不合适的参数而丢失了同源性弱但却具有统计学显著性意义的重要信息，给以后的实验带来难以想像的困难。

另外，在实际操作时应注意，不同的软件要求相应的文件格式，如果遇到什么困难，认真阅读“帮助”或“使用指导”。

13.4.4　DNA 序列的注释与提交

前面介绍的 3 大核酸数据库都为用户提供了用于测序数据提交的工具。本节以笔者克隆的人两歧双歧杆菌 M203049 的 16S rDNA 序列为例，说明如何向 GenBank 提交数据。首先进入 NCBI 主页，点击“GenBank sequence submission support and software”，再点击“BankIt”，再点“New”，按要求根据你的实际情况填写相关信息，点“validate and continue”。如果需要修改，按提示修改后重新点生效，如果不需要修改，点“submitt to GenBank”，提交结果会显示在当前网页上，并通过电子邮件通知提交者。其格式如下：

```
LOCUS       bankit763665        557 bp ss-RNA      linear      BCT 21-DEC-2005
DEFINITION  B.bifdum M203049 16S rDNA sequence.
```

ACCESSION bankit763665; DQ338568(Genbank 接受号)

KEYWORDS

SOURCE Bifidobacterium bifidum.

ORGANISM Bifidobacterium bifidum

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Bifidobacteriales;

Bifidobacteriaceae; Bifidobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 557)

AUTHORS MA, Y., ZHONG,Z., YI, F., SONG, F. and QIU, Z.

TITLE solation and Identification a Bifidobacterium bifidum strain with a plasmid

JOURNAL CHINESS JOURNAL OF MICROECOLOGY 16(1):132-137 (2004)

REFERENCE 2 (bases 1 to 557)

AUTHORS MA, Y., ZHONG, Z., YI, F., SONG, F. and QIU, Z.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (21-DEC-2005) Biochemistry and molecular biology,

Chongqing university of medical sciences, YIXUEYUAN Road,NO.1,

Chongqing, chongqing 400016, P. R. China

COMMENT Bankit Comment: Using bifidobacterium 16S rDNA primer g-bif as

described by Matsuki T(2002),we amplified a 16S rDNA sequence from

a novel isolated Bifidobacterium strain M203049.

FEATURES Location/Qualifiers

Source 1..557

/organism="Bifidobacterium bifidum"

/db_xref="taxon:1681"

BASE COUNT 115 a 128 c 202 g 112 t

ORIGIN

1 ctcctggaaa cgggtgggcc ggagctcagt tgactgaatg gtcttctggg aaagctttcg

61 cggtatggga tggggtcgcg tcctatcagc ttgacggcgg ggtaacggcc caccgtggct

121 tcgacgggta gccggcctga gagggcgacc ggccacattg ggactgagat acggcccaga

181 ctcctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg cgcaagcctg atgcagcgac

241 gccgcgtgag ggatggaggc cttcgggttg taaacctctt ttatcgggga gcaagcgaga

301 gtgagtttac ccgttgaata agcaccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt

361 agggtgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagggc tcgtaggcgg ttcgtcgcgt

421 ccggtgtgaa agtccatcgc ttaacggtgg atccgcgccg ggtacgggcg ggcttgagtg

481 cggtagggga gactggaatt cccggtgtaa cggtggaatg tgtagatatc gagcctgtag

541 atatcgggaa gaacacc

//

13.5　蛋白质序列分析应用举例

13.5.1　蛋白质相似性分析——BLASTp 和 alignment

与核酸序列对齐分析一样，蛋白质序列对齐分析的目的是通过将两个或多个蛋白质序列进行对齐，并将其中相似的结构区域突出显示出来，通过比较未知序列与功能和结构已知的序列之间的同源性来预测未知序列的功能。图 13.12 是用 CLUSTALW 对 pBIF10 Rep 与其他 5 种细菌 Rep 蛋白 121～180 保守区氨基酸残基进行多序列比对的结果。



图 13.12　pBIF10 Rep 与其他 5 种细菌 Rep 蛋白 121～180 保守区氨基酸残基的多序列比对结果

序列的 GenBank 编号为：1. CAA60390；2. CAA60389；3. pBIF10_rep；4. AAT09350；5. AAL73041；6. CAC38003

13.5.2　蛋白质二级结构预测（包括螺旋、卷曲、疏水性、跨膜区、信号肽等基本元件的分析）

根据著名的 Anffinsen 原则，氨基酸一级结构决定蛋白质的高级结构，也就是说蛋白质可以自发地折叠成它们天然的结构，其折叠的方式在一定程度上就编码在氨基酸序列中。当一段多肽链的氨基酸序列确定后，其二级结构、三级结构等高级结构的特征就已经蕴藏在其中。因此，要预测蛋白质的高级结构，就首先要对其二级结构进行预测，二级结构的主要特征结构是一些 α 螺旋、β 折叠，无规则卷曲、β 转角等基本结构单元，同源蛋白的保守序列也就存在于维持这些基本单元的片段内。

二级结构预测的基本理论就是氨基酸对二级结构的偏好性。即氨基酸似乎对特定的二级结构状态有偏好，例如，Glu 对螺旋二级结构有强烈偏好，Val 有位于链中的强烈偏好，Gly 和 Pro 偏好位于回环中，一些疏水氨基酸（如 Phe）对两种二级结构都有强烈的偏好，体现了它们构造结构核心的倾向。然而，没有一种偏好是

特别强烈的,所有的氨基酸都常常能在每种二级结构中被发现,这意味着二级结构预测不能建立在个别残基的基础上,而是要综合考察任一残基两旁的几个残基的信息做出整体中的局部预测。

```
          10        20        30        40        50        60        70
           |         |         |         |         |         |         |
MAIKITNKDVIQSYLMTVSKYDFSVYEKRILYRLVEAMQCEIEGKKLYPGLRIEKTLYDDR
VVLMPISAF
eeeeeccthhhhhhhhhhhhhhcchhhhhhhhhhhhhhccttcccccccccceehhhhhhhteeeechhhh
LANDDDENYTRVKKALLDLRNKSFEFDDGQIWKVIGIIEKPQFNYKRGWVRFEIQPEVYN
AVLNFSKGFR
hccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhheeeccccceeeeeeeeecccccccccceeeecchhhhhhhhhhhhtthh
KYELKTAMEFTSQYSMRFYELMSGQERPLIYTIEDLKIMFGVQDKYKRNPDFIKRIIVPAK
EELDAKSPY
hechhhhhhhcchhhhhhhhhhhhhhhccceeeehhhhhhhhhhhcccccccchhhhhhhhhhhhhhhhcccccce
SFEYKILKEGRSFHSLKLYPKYQPEHRDEELEKHELQKQVSLGWDLDRLIRNYLKQELLF
TRPGNKKQHR
eeeeehhcttcccceeeeeecccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhcccchhhhhhhhhhhhhheeeecttcccccc
PLQGCTEET
cccccccchh
```

Sequence length:　**289**

SOPMA:

Alpha helix	(Hh):	146 is	50.52%
3_{10} helix	(Gg):	0 is	0.00%
Pi helix	(Ii):	0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb):	0 is	0.00%
Extended strand	(Ee):	47 is	16.26%
Beta turn	(Tt):	10 is	3.46%
Bend region	(Ss):	0 is	0.00%
Random coil	(Cc):	86 is	29.76%
Ambigous states	(?):	0 is	0.00%
Other states	:	0 is	0.00%

图 13.13 是用 NPS@网站(http://npsa-pbil.ibcp.fr/)提供的 SOPMA 软件(self-optimized prediction method)对 pBIF10 编码的 Rep 蛋白进行二级结构预测的结果。显示出明显的螺旋和无规则卷曲相间的有序排列。

DNAStar 的 Protean 也可以进行蛋白质的二级结构预测,此外,还可以预测等电点、相对分子质量等,请读者自己下载软件试一试。

另外,值得推荐的是 Invitrogen 公司的 VectorVTi 的在线服务软件,是分析核

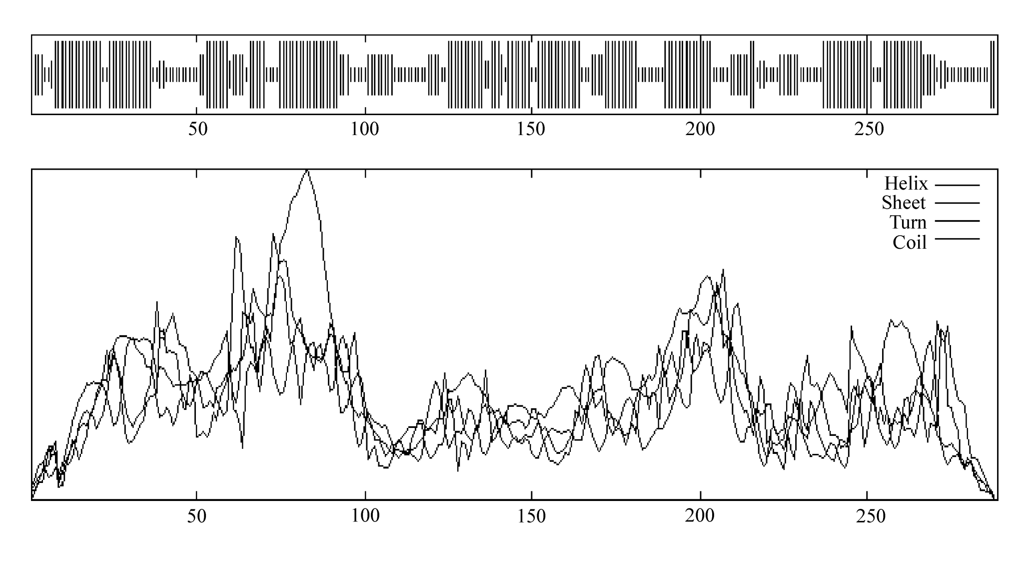


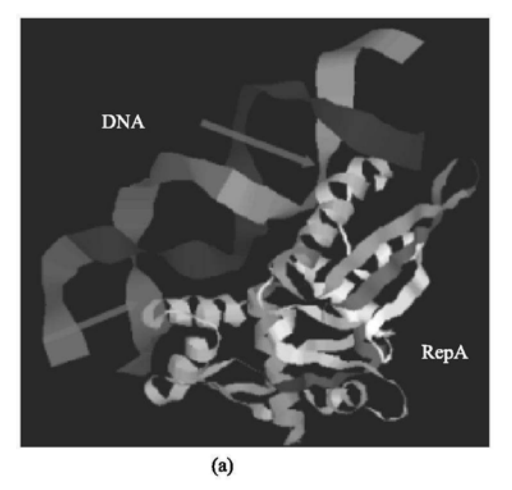
图 13.13　pBIF10_Rep A 二级结构预测结果(SOPMA)

酸和蛋白质序列的很好的工具,可以满足序列分析与比对、酶切图谱、质粒绘图、ORF 预测等多种需求,读者可以自己登录到网站的 TOOLs 中去试一试(http://www.invitrogen.com)。

13.5.3　蛋白质高级结构预测(比较建模法)

事实上,蛋白质的功能集中体现在它形成的高级结构中,尤其是在与配体相结合的功能性部位的正确结构中。因此,通过计算机模拟技术构建 3D 结构,对预测已经经过二级结构预测的蛋白质的性质和功能具有很大的参考和佐证价值。严格意义上的蛋白质 3D 结构是建立在蛋白质晶体结构 X 射线衍射结果之上的,一般的研究机构和个人是很难做到的。目前,已经有许多研究机构和实验室建立了大量的基于蛋白质晶体结构 X 射线衍射结果的蛋白质 3D 结构数据库,通过互联网的蛋白质 3D 结构预测已经能够在普通的用户端完成。只要将目标蛋白质序列在数据库中进行比对,就可以搜索到相似性很好的同源蛋白质的 3D 结构模型,这也就是常用的比较建模法。其理论基础是"在 80 个以上残基的联配中,相似性达到 25%以上的两个蛋白质序列采用的是相同的基本结构"。在 25%以下,两条蛋白质序列可能具有相似的功能,也可能是性质上完全不同的蛋白质。

比较建模的精确性通常以预测结构和目标序列真实结构之间的 α 碳原子位置距离的均方差(RMSD)来衡量,低于 1.0Å 的 RMSD 值说明预测结果非常好。如果模板序列与目标序列间的相似度超过 70%,即使用全自动方法,预测模型精度 RMSD 低于 2～3Å 也是合理的。图 13.14 是用 NIG(http://spock.genes.nig.ac.jp/genome/gtop.html)提供的 GTOP(genomes to protein structure and func-



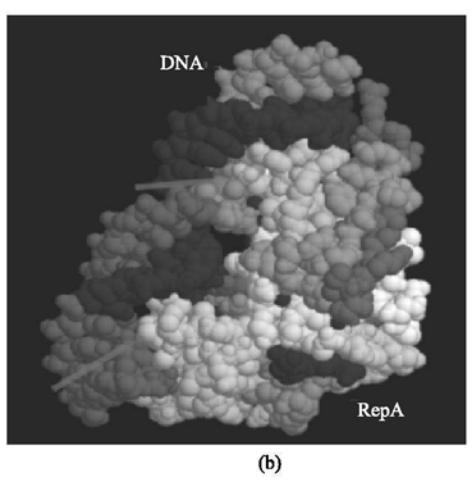


图 13.14　pBIF10 的 Rep 蛋白的 3D 结构预测

（a）RepA 与 DNA 分子相互作用的 ribbons 模型；(b)RepA 与 DNA 相互作用的 facefilled 模型

[illegible]）软件对 pBIF10 的 Rep 蛋白通过比较建模法预测的 3D 结构。

13.6　蛋白质组学研究中的数据分析

13.6.1　PMF 的数据库检索

1. 数据库的选择

在蛋白质组学研究中，常用于检索的数据库有 3 种：OWL、NCBInr 和 DbEST。

（1）OWL

这是一种复合的非冗余数据库（NRDB），它的来源有 4 种：SWISS-PROT，GenBank（translation）、PIR 和 1NRL-3D。SWISS-PROT 是最先建立的非冗余数据库，其他的 NRDB 都建立在它的基础上。严格的非冗余规则使 OWL 相对较小，因此在简单搜索中是非常有效的。

SWISS-PROT 蛋白质序列数据库由瑞士日内瓦大学于 1986 年创建，目前由瑞士生物信息学研究所（Swiss Institute of Bioinformatics，SIB）和欧洲生物信息学研究所（European Bioinformatics Institute，EBI）共同维护和管理。SIB 创建的蛋白质分析专家系统（expert protein analysis system，ExPASy）Web 服务器除了开发和维护 SWISS-PROT 数据库外，也是国际上蛋白质组和蛋白质分子研究的主要网站，为用户提供大量蛋白质资源。

（2）NCBInr

这也是一种复合的非冗余数据库，它由 NCBI 提供，搜索的工具是 BLAST

和 Entrez。它来源于 GenBank 的 CDS 翻译序列和 PIR、SWISS-PROT、RPF、PDB。

（3）DbEST

该数据库选取了 GenBank 的一部分，即那些“单通过”的 cDNA 序列或在大量组织中表达的序列标签。这是一个非常大的数据库，搜索所需的时间长。因此，只有在用 OWL 和 NCBInr 都搜索失败时才使用 DbEST 搜索。

2. 用于 PMF 的软件工具

实际样品的 MALDI-TON MS 谱图中一般有几十个 m/z 信号，这些信号是进行蛋白质鉴定的最原始的数据，如何在最优的条件下利用好这些数据是取得好的鉴定结果的关键。在蛋白质组学研究中，利用 PMF 软件工具来达到这一目的，通过在数据库中进行检索，将匹配的蛋白质寻找出来。

PMF 软件工具采用给结果评分的思路来确认蛋白质，即软件预测的蛋白质虚拟酶解的肽段数与实际样品 MALDI-TON MS 谱图中几十个 m/z 信号的匹配率越高，所检索出来的蛋白质得分越高。因此，现行的软件程序均采用得分算法。这些算法可校正由于蛋白质大小不同引起的得分偏倚，也可校正数据库中较小的肽与用于检索的 m/z 信号有较多匹配的倾向，某些算法使用概率统计以便更好地定义蛋白质鉴定的意义。

现行的 PMF 软件工具有 3 类：

（1）根据谱图中的 m/z 值与数据库中给定误差范围内的 m/z 值相匹配的数目给出得分。这类软件有 PepSea（http://www.protana.com）、PeptIdent/MultIdent（http://www.ch/tools/peptident.html）。

（2）使用的得分算法考虑到蛋白质大小和肽片段长度对匹配概率的影响。这类软件有：MOWSE（http://srs.hgmp.mrc.ac.uk/cgibn/mowse）、MS-Fit（http://prospector.ucsf.edu）。

（3）更多使用基于概率的得分，提供得分的统计基础，估计某些匹配可能是反映随机事件而不是真实特性的概率。这类软件有：ProFound（http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound）、Mascot（http://www.matrixscience.com）。

Mascot 是基于概率统计的得分算法（MOWSE）而建立的，它提供得分的统计基础，估计某些匹配可能反映的随机事件。MOWSE 打分体系的优点是：用简单的规则来判断一个结果是否显著，实现对数据库的快速查询；不同形式的匹配结果可以在同一查询过程中实现；基于不同数据库的不同查询结果可以互相比较；查询参数通过反复实践更容易被优化。Mascot 可运行在几乎所有主流计算机的平台上（如 Linux、Windows NT、Windows 2000、Unix、Solaris）；可直接接受各大生物质谱公司（Agilent，Bruker，ThermoFinnigan，Kratos/Shimadzu，Micromass/Waters，

Applied Biosystems 等)的肽质量指纹谱(PMF)数据格式或支持它们的纯文本串级质谱数据。

Mascot 系统的特点是:利用多处理器系统处理数据,功能大为增强;完全基于 Web 界面;去除了对数据库进行索引的处理方法;可以处理固定和可变修饰的情况;增加了概率打分和支持 MS/MS 数据查询,支持多种流行数据库;数据处理速度大大增加。Mascot 的 PMF 搜索界面见图 13.15(由 http://www.matrix-science.com/search_form_select.html 进入)。

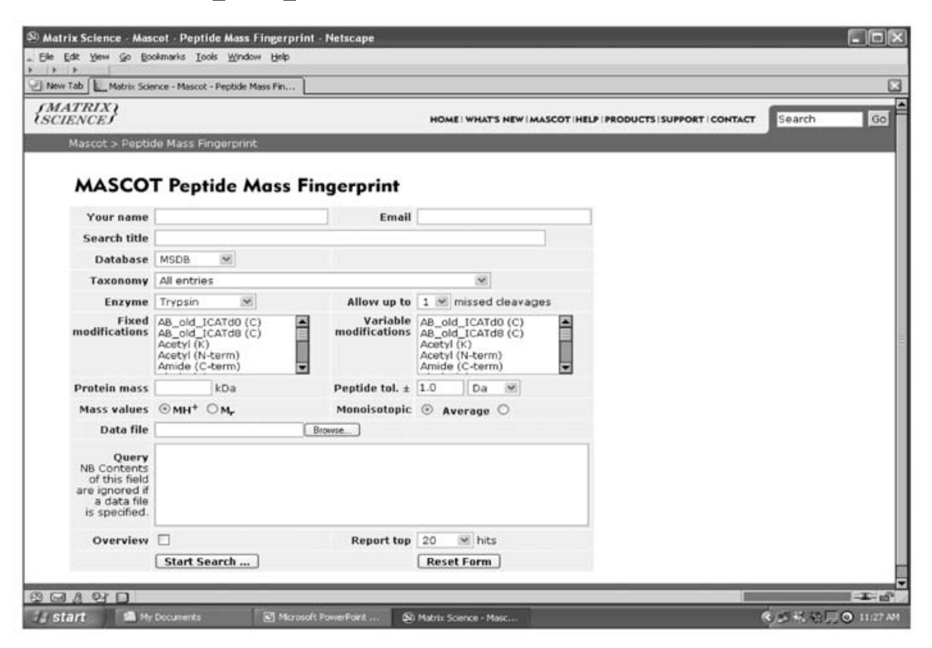


图 13.15　Mascot 的 PMF 搜索界面

3. 分类

为了得到好的匹配结果,需通过各种软件工具的搜索界面进行搜索参数的设置。以 Mascot 为例,一共有 17 项内容(图 13.15 中有包含下列项内容的窗口):

(1) 用户的姓名和 E-mail 地址。这样不仅可以通过 Web 浏览的方式等待搜索结果,还可以收到搜索结果的 E-mail。

(2) 搜索的题目(title)。

(3) 选择搜索的数据库(database)。在 Mascot 中,有 MSDB(comprehensive, non-identical database)、NCBInr、SWISS-PROT、Random(random sequences for verifying scoring statistics)、OWL5 种类型可以选择。作 MS/MS 搜索时,还增加了 EST divisions of Genbank(currently EST_human, EST_mouse, EST_ot)来限

制蛋白质的来源。Mascot 一共有 30 个选项,涵盖了从单细胞生物到哺乳动物的物种。有些数据库并不严格区分物种,可以选 all entries。

(4) 限定酶。例如,Mascot 提供可选择的酶有:Trypsin、Lys-C、Lys-C/P、Arg-C、V8-E、V8-DE、chymotrypsin、Asp-N、pepsin A。还列出了两种化学裂解剂(CNBr、甲酸)。

(5) 选用单同位素还是平均(monoisotopic/average)质量值。

(6) 修饰(modification)。分为确定的修饰(fixed modification)和可变的修饰(variable modification)两种。修饰参数的设置是考虑到在 SDS-PAGE 中半胱氨酸巯基被丙烯酰胺修饰以及在酶解过程中可能发生还原和烷基化,同时,还要考虑常见的蛋白质修饰,如磷酸化、硫化、糖基化和 N 端修饰等。修饰参数设置后,软件会自动处理指定肽段修饰前后 MS 数据,并与数据库中的条目匹配。

(7) 蛋白质质量(protein mass)。用来限定蛋白质质量的搜索范围。

(8) 肽质量容差值(peptide tol.±)和碎片质量容差值(MS/MS tol.±)。只有用精确的 m/z 值进行数据库搜索,才有可能得到好的结果,因此,肽质量容差值或碎片质量容差值的设定越大,搜索的结果越难以肯定。在 Mascot 中,肽质量容差值设定方式有 4 种:Da、mmu、%、ppm。一般,该参数的设置为±0.5 Da 或±0.1 Da。

(9) 质量值(mass value)。可选分子离子(MH^+)或中性分子(M_r)。

(10) 未切开位点(miss cleavage)。如果不能确定酶解充分,可选 1 或 2,但没有充分理由不要选大于 2 的数。如果允许漏掉切割,肽片段目录中会包括酶不完全消化产生的肽段。

(11) 数据文件(data file)。输入需要上传的文本文件的路径。

(12) 查询(query)。这是 PMF 和序列信息方式搜索界面的一个窗口。如果未上传数据文件则使用这个窗口贴入数据。对 PMF,它是一系列肽质量值,每行只有一个值。对序列信息搜索,每行必须包含一个肽质量值和对这个肽的限定语句,如 M seq(…)comp(…)ions(…)。

(13) 概要(overview)。若选择了此项,结果中将出现 Overview 表格。

(14) 最大报告数目(report top)。要求搜索后给出结果的数目(5～50 个)。

对 PMF 和 MS/MS 数据搜索,以上参数都是必要的。此外,对于 MS/MS 数据搜索,还须设置两项搜索参数(在 Mascot 的 MS/MS 搜索界面上可以看到)。

4. 结果的报告格式

(1) 表头(header)。包括搜索的题目、日期、用户名字、选用的数据库等。

(2) 得分分布(score distribution)。

在 Mascot 的 PMF 搜索结果中,会给出一个柱状图(图 13.16)。图中,横轴表示搜索得分,纵轴表示匹配的蛋白质数目,阴影区表示不可信的结果($P>0.05$)。

在阴影区的边界,即得分等于61处,随机概率 $P=0.05$(即一种随机匹配的可能性为0.05)。所以,只有得分大于61的结果才是可信的,可信度最高的是得分为210的4种蛋白质。

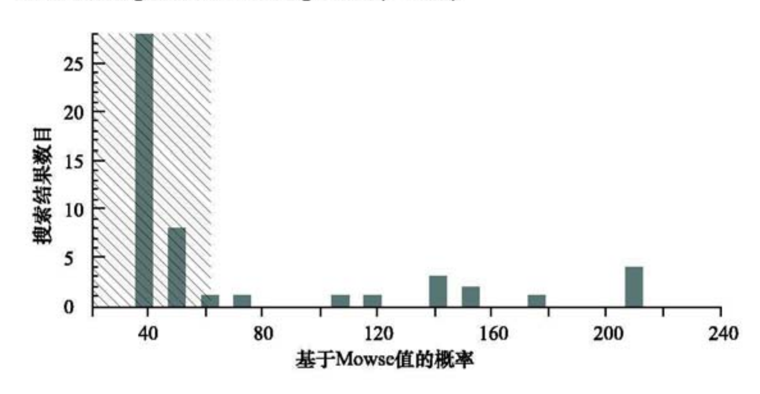


图 13.16　搜索的结果:Mascot给出的柱状图

(3) 报告样式。分 protein summary 和 peptide summary,两种报告形式可以切换选择。对PMF,不包括 peptide summary。

(4) 概要表(overview Table)。是一个多维的表格,横行代表用于查询的质量段,纵列代表匹配的结果。

(5) 蛋白质概要(protein summary)。这是一个PMF搜索的匹配结果,可以看到关于搜索出的蛋白质的详细结果。

13.6.2　从MS/MS数据鉴定蛋白质的算法和工具

基于MS/MS数据库鉴定蛋白质的软件工具列于表13.2。使用这些软件进行MS/MS数据库搜索,一般可在一两个小时内得到结果,随着操作者熟练程度的增加,时间还会大大缩短。目前常用的是Sequest和Mascot。

表 13.2　从MS/MS数据鉴定蛋白质的常用软件工具

软件名称	搜索与评分方法	网址
Sequest	Cross-correlation	http://www.thermo.com
Mascot	MOWSE;probability	http://www.matrixscience.com
Sonar MS/MS	vecyor algebra ; probability	http://www.genomicsolutions.com

续表

软件名称	搜索与评分方法	网址
Guten Tag	fragment ion tags	http://www.filds.scripps.edu/GutenTag/index.html
MS-tag	fragment ion tags	http://prospector.ucsf.edu
Pep-Frag	fragment ion tags	http://prowl.rockefeller,edu/PROWL/pepfragch.html
Pep-Sea	peptide sequence tag	http://www. narrador. emblheidelberg. de/GroupPages/Homepage.html

这与花费成百上千小时进行从头计算、再用 BLAST 检索鉴定蛋白质的 *de novo* 策略相比，无疑是一个很大的进步。

1. Sequest

使 MS/MS 数据与数据库序列匹配以鉴定蛋白质的第一个算法/程序是建立在相关分析基础上的 Sequest。Sequest 算法和系统是由美国华盛顿大学的 Jone Yate 开发，并由 Finnigan 质谱公司整合到质谱数据分析系统，已成为目前最常用的蛋白质鉴定软件之一。其基本的工作流程是[8]：

(1) 打开 Sequest 程序，选择含有要分析的 MS/MS 扫描数据文件夹，标明对蛋白质进行消化所用的酶，指定要用于 MS/MS 分析的是单电荷离子还是双电荷离子，选择要与 MS/MS 数据进行比对的数据库。

(2) 输入每一个选出的母离子碎片质谱的 m/z 数据，选择数据库中具有相同质量的肽(在指定的误差范围内)。如果不指定消化酶，程序将选择所有与指定的母离子质量相当的肽序列。

(3) 对每一个所选的肽序列，通过指定的酶进行虚拟消化，产生理论 MS/MS 谱图。

(4) 将母离子被分析的 MS/MS 谱图与从数据库产生的所有理论 MS/MS 谱图进行比较。

(5) 计算实验所得的 MS/MS 谱图与理论 MS/MS 谱图之间的每一个匹配的相关得分，包括理论 b 离子、y 离子与实际 MS/MS 谱图的匹配得分、计算相关得分以及排序分等。

使用者可以根据报告的相关性得分，或通过将“最佳匹配”肽的可能的 b 离子、y 离子迭加在实际 MS/MS 谱图上来评估匹配情况。Sequest 不对所得到的匹配质量作出判断，只是提供出相关性的大小和排序供使用者选择。

2. Mascot

Mascot 的特点已在 13.6.1 中有比较详细的介绍。Mascot 实际上是可用于 PMF 和 MS/MS 数据分析的一组程序，只是在进行 MS/MS 数据分析时，除了要提出与 PMF 分析时类似的限定参数外，还需对 MS/MS 数据分析必需的参数，包括对母离子(precursor)m/z 及母离子所带电荷数(peptide charge)进行限定。对 ESI-MS 的数据，如果不能确定母离子所带电荷数，可选"2+"和"3+"，对于 MALDI-PSD，总选"1+"。其搜索界面见图 13.17(由 http://www.matrix-science.com/search_form_select.html 进入)。

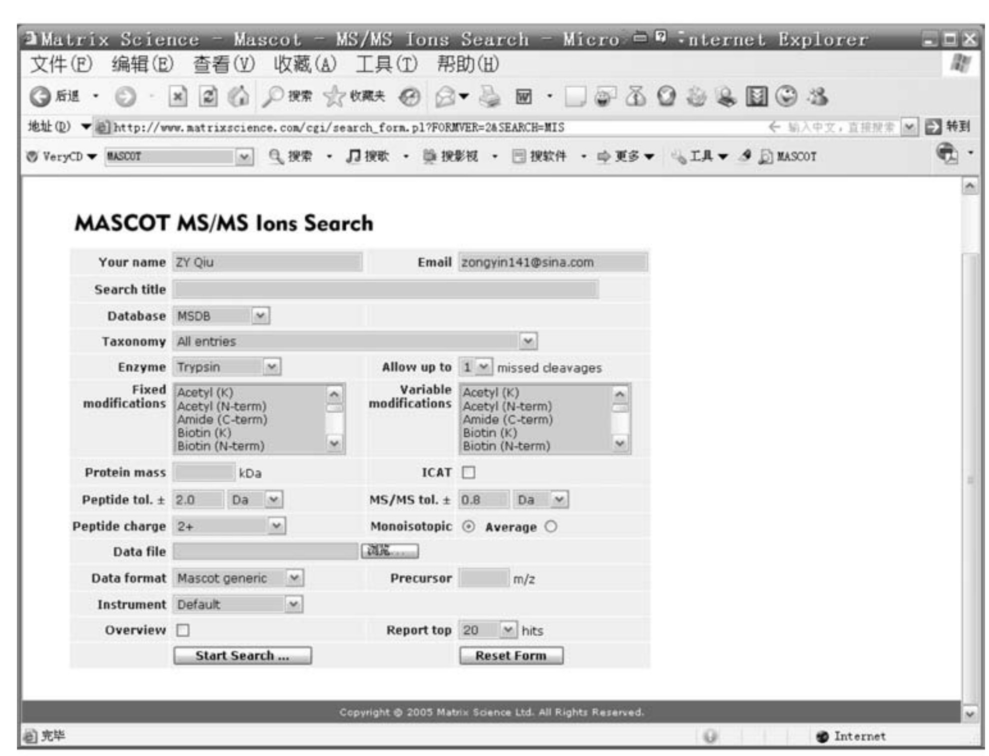


图 13.17 Mascot 的 MS/MS 搜索界面

13.6.3 从肽序列标签(peptide sequence tag，PST)策略鉴定蛋白质的算法和工具

目前用于 PST 检索的软件有 Mascot、PeptideSearch、Pepsea 等。Mascot 所提供的肽序列标签鉴定蛋白质的软件是 Mascot Sequence Query，搜索界面见图 13.18(由 http://www.matrixscience.com/search_form_select.html 进入)，查

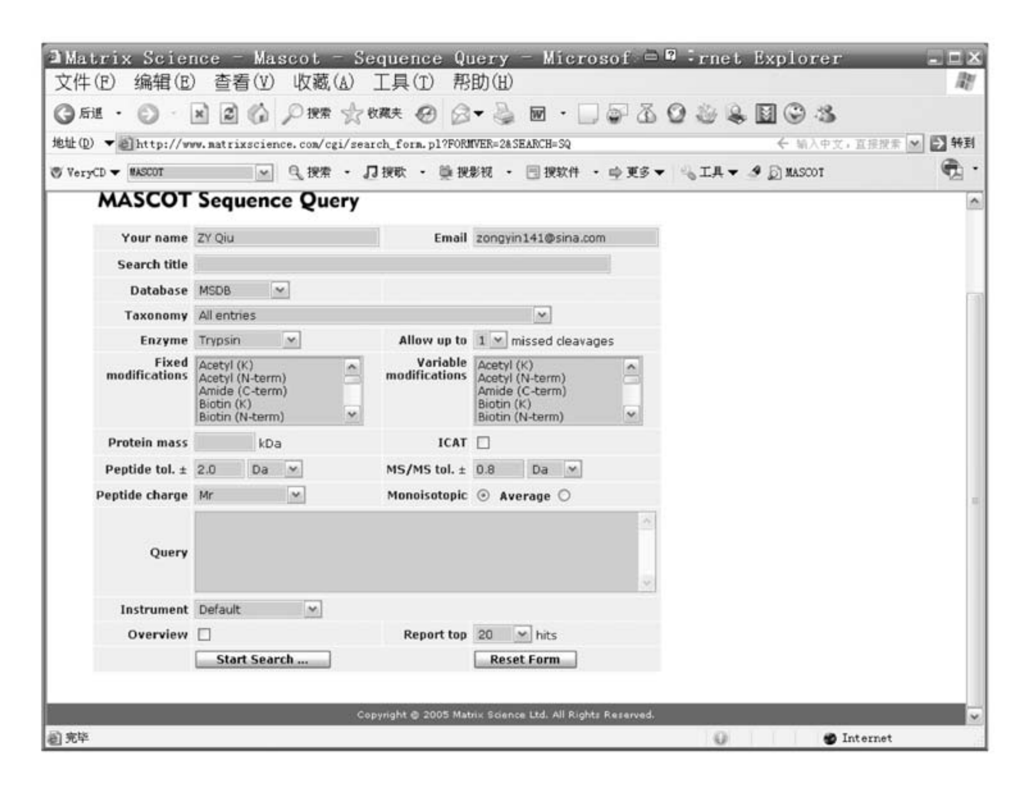


图 13.18 Mascot Sequence Query 的搜索界面

询界面上的 Query 是用于肽序列标签的输入区。

参 考 文 献

[1] 张成岗，贺福初．生物信息学：方法与实践．北京：科学出版社，2002

[2] 尚彤，国强华，景霞．常用医学生物信息学数据库．北京：北京大学医学出版社，2003

[3] 韦斯特海德 D R 等．生物信息学．王明怡等译．北京：科学出版社，2004

[4] Spalding J B, Peter J. *Nucleic Acids Res*. 2004, **32**: W26

[5] Geourjon C, Deleage G.. *Comput. Appl. Biosci*. 1995, **11**: 681

[6] Kawabata T, Fukuchi S, Homma K et al. *Nucleic Res*. 2002, **30**: 294

[7] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C et al. *Nucleic Acids Res*. 2003, **31**: 3784

[8] John R Yates, Jimmy K Eng, Ashley L et al. *Anal. Chem*. 1995, **67**: 1426

第 14 章　细胞分析化学

细胞是有机体结构和生命活动的基本单位，生命的运动都在细胞内得以实现。细胞化学研究不仅有利于解释细胞及生物体的生理活动，而且有利于阐明各种疾病（如癌症）的发病与治疗机制。正常生理条件和特殊的病理状态下，机体在细胞水平上的表达是不同的，生命过程的研究需要对来自于细胞的样品进行分析。

由于受取样技术及检测灵敏度的限制，细胞化学成分的常规分析方法一般以大量细胞为研究对象，用平均结果反映单个细胞的化学信息。然而，由于生物组织中各种化学成分分布及细胞本身的高度不均匀性，大量细胞分析常常得出不准确甚至错误的结论，因此，直接分析单个细胞的化学成分十分重要，主要体现在：①揭示不同细胞在化学组成、生理响应等方面的差异性，进而有助于解释细胞的一些生理现象。②有利于疾病的早期诊断。在发病早期，仅有极少量细胞发生病变，如果采用大量细胞同时分析，微弱的致病信号就会被来源于大量正常细胞的平均信号完全掩盖。只有逐一分析单个细胞，才有发现极少量病变细胞的可能。③有利于药物设计及疾病的合理治疗。不论是正常细胞和病变细胞之间，还是病变组织内部各个病变细胞之间，在药物吸收、释放、分布、代谢等方面都可能存在很大差异。准确、客观地揭示这种差异对设计靶向药物、靶向药物剂型以及个性化药物治疗方案都是非常有利的。

由于单个细胞十分微小，细胞内化学组分为超痕量，大量组分结构相似，因此单细胞分析是一个极富挑战性的研究领域，激发了研究者的浓厚兴趣。近十几年来，毛细管电泳技术、图像分析、细胞电化学及传感技术和实时动态检测单细胞的研究水平的迅速提高，促进了单细胞分析的发展。

14.1　细胞毛细管电泳分析

在多种细胞分析技术中，毛细管电泳（capillary electrophoresis，CE）技术具有分离速度快、进样量小（对 5 μm 内径毛细管取样量可低至 65 fl）、灵敏度高（安培检测器和激光诱导荧光检测器可达 amol 至 zmol）、分离效率高（10^5～10^6 理论塔板数 m^{-1}）、能采用生物相容性缓冲液、可操作性强等优点。毛细管电泳技术应用于细胞分析的主要有 3 类，即：细胞颗粒电泳、大量细胞提取物分析和单细胞分析。在细胞颗粒电泳中，分离对象的重点是不同时期细胞的分选，如凋亡细胞、坏死细胞和正常细胞；对于细胞提取物或者单细胞分析来说，分析的目标则是细胞内容物

如蛋白质、DNA、糖类等的含量，细胞外源性物质如各种药物，特别是化疗药物在细胞中的转导、代谢等。在单个细胞的水平上进行研究，可以更准确、更全面地反映细胞生理状态和过程的信息，了解细胞群体中特殊的细胞功能，深入认识细胞个体差异、细胞间相互作用和信息传递以及神经递质、药物或毒物刺激产生的生理影响。所以自 20 世纪 80 年代末期以来，单细胞的毛细管电泳分析取得了令人瞩目的研究成果。

14.1.1　单细胞进样技术

1. 细胞悬浮液制备

制备细胞悬浮液时，应彻底清洗细胞，除去细胞外基质中可能存在的干扰 CE 分析的物质。清洗液必须与细胞等渗，且不得含任何促分泌剂，以防细胞过早被溶解及细胞内组分分泌释放。常用清洗液为平衡盐溶液和磷酸缓冲盐溶液，二者也常被用于制备最终的细胞悬浮液。细胞悬浮液的制备过程通常是将一定体积的细胞置于含有适量清洗液的有盖离心管中(黏附细胞要先脱离培养瓶)，轻轻混匀，离心去除上清液，加入另一份适量清洗液，重复上述操作。清洗一般需重复 2～8 次，据细胞及基质环境而定。清洗后的细胞重新悬浮于等渗溶液中，供单个细胞进样[1]。

2. 单个细胞进样技术

单个细胞体积微小(nl 至 fl)，活细胞易被吸附，这使细胞进样较困难，需要一定的操作技术，因此，细胞进样是单细胞 CE 分析的一大关键。一般是在显微镜下借助三维微操作器进样。由于动物细胞和植物细胞在结构和性质上存在差异，故其进样方法也有所不同。

1) 单个动物细胞进样

目前，单个动物细胞进样方法主要有单个细胞溶解进样、单个全细胞进样以及活体细胞质进样。

(1) 单个细胞溶解进样

单细胞溶解进样是将单细胞分离后，置于微型管状瓶中，匀化、离心，再将上层清液转移到另一微型管状瓶中，加入试剂衍生化。用微进样器移取部分样品进入毛细管，进行分离检测[2]。该法通过校正可准确移取 1 nl 的样品。这种方法能使细胞溶解完全，内标或衍生试剂与试样反应完全，但是使样品被稀释，细胞组分一次不能 100%进样，使检出限变差，且需熟练的掌握微量操作技术，现在已很少采用。

(2) 单个全细胞进样

在毛细管电泳的单个细胞分析中，大多采用单个全细胞进样。分离毛细管的

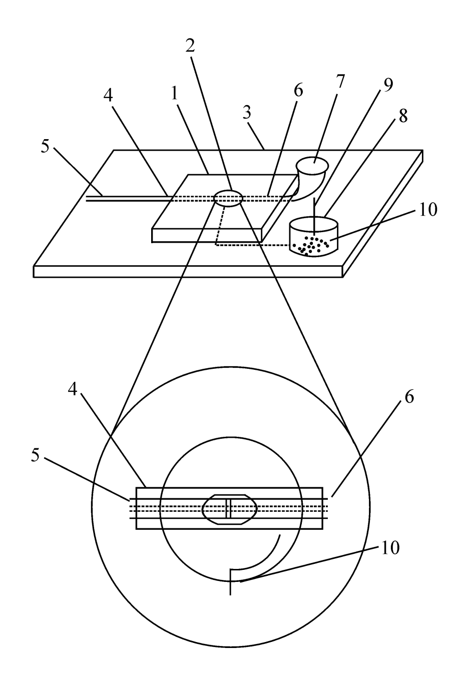


图 14.1　细胞进样器

1. 有机玻璃立方体；2. 圆孔；3. 显微镜载物台；4. 金属管；5. 分离毛细管；6. 进样毛细管；7. 喇叭状毛细管；8. 电极槽；9. 阳极端；10. 铂丝[5]

进样端被用作微进样器。分离的单个细胞用电迁移[3]或流体动力学[4]（压入或吸入）方法将整个细胞进样到分离毛细管内，在毛细管内溶解细胞膜，再用高压电泳分离及检测。由于将单个细胞全部进样保证了细胞组分的100%进样，使细胞内低含量组分获得最佳检出限。此法的缺点主要有：细胞悬浮液滴发生对流扰动，使毛细管进样端很难靠近细胞；细胞在承载体（载玻片、培养皿）表面的牢固吸附妨碍进样；随细胞一同被引入毛细管的细胞培养液干扰细胞溶解、溶质分离，甚至整个 CE 系统；对低密度细胞悬浮液，单个细胞进样耗时长。

金文睿等[5]设计了一种细胞进样器，适合于低密度细胞悬浮液的单细胞快速进样，见图 14.1。分离毛细管和进样毛细管之间的距离为 5 μm，细胞悬浮液置于喇叭状玻璃管中，当一个细胞出现在两毛细管之间时，启动电压，将细胞引入分离毛细管进样端。将这种进样器用于低密度人淋巴细胞悬浮液，单个细胞的进样过程需 3～4 min，而常规电动进样需 30～60 min 或更长时间。

Chen 等[6]设计了一种单细胞连续进样电泳分析装置。装置包括细胞进样毛细管 A 和电泳分离毛细管 B，两根毛细管之间用一根 5 mm 长的特弗隆管连接，特弗隆管连接处置于缓冲液中。当高压施加在两根毛细管两端时，细胞被连续“泵”入毛细管中，细胞在接口处受到挤压等力的作用破膜进入电泳分离毛细管，然后用激光诱导荧光（LIF）检测。此法目前只能分析红细胞，分析一个细胞的平均时间不超过 4 min，而且不需要显微镜和微操作器。

Chiu 等[7]利用光捕获技术和进样端拉制极细的毛细管，成功地将超小体积的单个分泌囊泡引入毛细管。

Krylov 等[8]设计了一个多功能细胞进样器，进样装置透明，毛细管不用蚀刻处理，分离毛细管竖直安放在选定细胞上，在显微镜的监控下，通过电迁移或压力引入细胞。该装置还包括 30 s 内用十二烷基磺酸钠使细胞破膜，以及每次进一单细胞后自动清洗毛细管的功能。

普通载玻片会对细胞强吸附，影响单细胞分析的取样和重现。Dovichi 等[9]用

疏水性二甲基二氯硅烷或氯化有机硅氧烷(Sigmacote)修饰玻璃或聚苯乙烯承载体表面,不能明显降低人结肠腺癌细胞 HT29 的吸附,而亲水性聚合物聚乙烯醇和聚甲基丙烯酸羟乙酯修饰的表面对这种细胞的吸附大大减弱。

(3) 活体细胞质进样

细胞质进样不需将细胞溶解,可进行活体单细胞分析。这种直接进样的方式避免了用微型注射器带来的进样区带扩张的弊病。但是大多数细胞,特别是哺乳动物细胞直径很小,微型进样器尖端不易插入细胞内,因此,此法目前主要应用于体积较大的神经细胞和卵母细胞。Luzzi 等[10]最近设计的细胞质进样装置(图 14.2)可在一系列软件自动控制下从非洲蟾蜍(*Xenopus laevis*)卵母细胞的局部位置快速获取 pl 至 nl 体积的细胞质,时间分辨率小于 500 ms,空间分辨率为 50 μm。

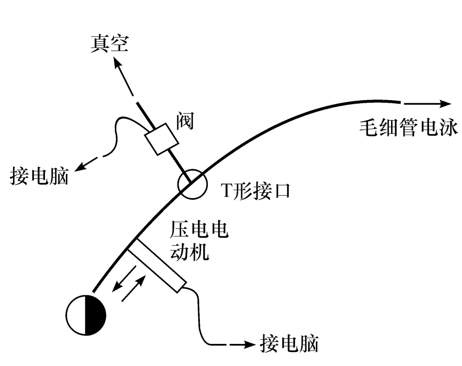


图 14.2　非洲蟾蜍卵母细胞的细胞质进样装置[10]

2) 单个植物细胞进样

与动物细胞不同,绝大部分植物细胞都有一层坚韧难溶的细胞壁并存在细胞膨胀运动,因此,单个植物细胞与单个动物细胞在进样方法上明显不同。液泡进样是单个植物细胞的常用进样方法,将毛细管插入一个植物细胞的液泡中,液泡汁便在细胞膨胀压作用下快速进入毛细管尖端,不需抽真空或施加电压。Olsson 等[11]先用酶消化法除去植物细胞的细胞壁得到裸细胞,再用电动法将单个裸细胞引入毛细管。

14.1.2　单细胞溶胞技术

细胞溶解一般需快速、完全,因为细胞在慢速溶解过程中,化学组分可能因不必要的生理活动而发生改变,致使分析结果不能真实反映细胞的实际生理状态[12]。常用的方法包括用低电渗溶液、表面活性剂、Tesla 线圈溶膜法、激光脉冲和电脉冲、超声等方法引起细胞膜破裂以达到溶胞的目的。

血红细胞、鼠交感神经细胞、蜗牛神经细胞等细胞在环境中 pH 或离子强度稍有变化时就会发生溶膜,所以用低离子强度 CE 缓冲液溶解细胞是最简单、最可行的细胞溶解技术。

表面活性剂溶胞法简单、方便、高效,在单细胞 CE 分析中应用最多。表面活性剂应能快速、完全溶解细胞,不干扰 CE 分离,不影响背景信号及被测组分的响

应信号。常用的有十二烷基磺酸钠、毛地黄皂苷、NaOH和烷基聚氧乙烯乙二醇醚类等。金文睿等[13~15]分别用0.1 mol·L^{-1}、0.02 mol·L^{-1}、0.01 mol·L^{-1} NaOH溶液溶解单个红细胞、鼠腹膜肥大细胞及鼠腹膜巨噬细胞，效果很好。

Xue等[16]设计了一个Tesla线圈，利用线圈诱导一外部电场加在淋巴细胞细胞膜上，当膜电位超过200 mV时，细胞就会破裂。

Allbritton等[17]利用高聚焦脉冲激光产生的振荡波将单个细胞快速溶解(33 ms)，溶解物很快被电迁移全部引入毛细管，有效防止了胞内酶活性在溶胞时发生改变，保证胞内组分不流失，但此法成本较高。2003年，Allbritton等[18]又发展了一种电脉冲法，能快速溶解单个黏附性细胞(鼠嗜碱性白血病细胞)，同时将细胞内溶物引入毛细管。电脉冲法的细胞溶解和溶解物进样效率与脉冲激光法相当，但电脉冲法更廉价、简便。

Zhang等[19]在分析单个结肠癌细胞株(HT29)细胞时，采用超声溶膜法。当单个细胞被引入毛细管进样端后，继之电迁移引入衍生试剂，然后把进样端放入一个含操作缓冲液的小管中，再将此管置于超声容器中65 ℃、30 s溶解细胞。

14.1.3 单细胞毛细管电泳分离方式

单细胞毛细管电泳分析一般采用毛细管区带电泳(CZE)。毛细管区带电泳的分离机制是基于各种被分离的物质的核质比间的差异。由于细胞膜的表面存在着带电的基团，如红细胞表面的唾液酸，使得细胞在电场中可以迁移，所以此法主要应用于细胞颗粒的电泳和细胞内小分子物质的分析。不同生理、病理条件下细胞膜表面的带电基团有差异，导致不同时期细胞在进行颗粒电泳时得以分离。也有用毛细管区带电泳分析细胞提取物中的肽类，如测定谷胱甘肽和二硫化谷胱甘肽的含量以判断细胞的氧化损伤程度[20]。其他分离模式包括毛细管等电聚焦、胶束电动毛细管电泳、免疫亲和毛细管电泳、非胶毛细管电泳(毛细管SDS-Dalton电泳)等，后两种主要用于细胞中多肽、蛋白质等生物大分子组分的分离检测。Dovichi等[21]采用毛细管SDS-Dalton电泳分析了单个人结肠腺癌细胞HT29中的多种蛋白质，其方法是：在CE缓冲液中加入0.1% SDS和筛分基质(8%支链淀粉)，将单个细胞引入毛细管，再引入少量1%SDS和3-(2-呋喃甲酰基)-喹啉-α-羰酰(FQCA)的混合液，溶解细胞后，将毛细管进样端放入含CE缓冲液的小瓶中，加热使蛋白质变性并被FQCA荧光标记，电泳分离及激光诱导荧光(LIF)检测不同相对分子质量蛋白质。与SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳相比，此法具有相似的峰容量，但重现性更好、灵敏度及分辨率更高、分析速度也更快。

14.1.4 单细胞分析毛细管电泳检测

检测是单细胞毛细管电泳分析的另一关键问题。由于单个细胞内组分的含量

非常低,一般在 fmol～zmol,所以需要高灵敏度的检测器。目前,单细胞毛细管电泳分析中的检测方法以激光诱导荧光法、电化学法为主,此外,还有质谱法、紫外吸收光谱法、免疫法和放射法,单细胞生物传感器检测法也已被应用。

1. 光诱导荧光法

激光诱导荧光(LIF)检测是 CE 最灵敏的检测方法,其检出限达到分子水平 ymol(10^{-24} mol)。由于检测的对象必须具有荧光,所以增加了检测的选择性和局限性。LIF 检测模式包括天然荧光(LINF)、化学衍生荧光、间接荧光、催化荧光等。LIF 检测装置的各种组件主要包括激光器、透镜、反射镜、各种类型和波长范围的滤光器、显微镜物镜(收集荧光)、光电倍增管(检测)。连续波激光器优于脉冲激光器,因为前者有更好的聚焦特性且对毛细管损伤小[22],还可进一步扩大衍生试剂的选择范围。

1) 天然荧光法

天然荧光法是最理想的 LIF 检测模式。胰岛素是 β-胰细胞中存在的一种具有调节葡萄糖代谢功能的重要激素。Yeung 等[23]采用 CE-LINF 对单个 βTC3 细胞中胰岛素含量进行测定,结果表明细胞之间的胰岛素含量变化显著。他们还发展了一种柱上分泌释放研究方法,可同时监测单个 βTC3 细胞胰岛素分泌释放量和该细胞胰岛素剩余量[24]。

儿茶酚胺类神经递质包括肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)等化合物。1995 年,Yeung 等[25]首次采用 CE-LINF 测定单个牛肾上腺嗜铬细胞中 E 和 NE 的含量,检出限分别达到 20 nmol · L^{-1} 和 50 nmol · L^{-1}。

细胞内组分(如组胺、5-羟色胺等生物调节剂)的功能性分泌释放可通过胞吐作用完成。Yeung 等[26]以硫酸多黏菌素 B 为促分泌剂,采用 CE-LINF 研究单个鼠腹膜肥大细胞中 5-羟色胺的柱上胞吐释放,检出限达到 117 amol,每个细胞平均含(1.6±0.6)fmol 5-羟色胺,平均释放(28%±14%)5-羟色胺。上述研究工作都采用紫外激光为激发光源。

Anderson 等[27]采用 CE-LINF 及 488 nm 激发光对单个鼠骨髓瘤细胞(NS-1)吸收的抗癌药物阿霉素及其代谢物进行分析,检出限达到(61±13) zmol。对同一种代谢物含量而言,单细胞分析所得结果比大量细胞提取法分析所得的结果至少高 100 倍,说明复杂提取过程易造成分析对象的严重损失及降解。25 个细胞的代谢图谱互不相同,显示出细胞间代谢行为的差异性。

2) 化学衍生荧光法

目前已用于单细胞 CE 分析的荧光衍生试剂有萘-2 ,3-二羧醛(NDA)、荧光胺

(FA)、邻苯二醛(OPA)、3-(2-呋喃甲酰)喹啉-2-羧醛(FQCA)、溴化乙锭(EB)、不对称菁染料 SYBR 绿 I(SYBR Green I)和 SYBR 金(SYBR Gold)丹酰肼(DH)、荧光素异硫氰酸盐(FITC)、单溴代双甲基吡唑酮(monobromobimane,mBBr)、4 ,5-二甲基-1 ,2-苯二胺(DMPD)等。其中,前面 7 种试剂本身不发射荧光。衍生方式包括柱前衍生、柱上衍生和柱后衍生。

(1) 柱前衍生

柱前衍生指经单细胞溶膜、组分衍生后才进入电泳分离毛细管的分析方法,包括溶解细胞法和完整活细胞法两种衍生方式。其优点是不必考虑衍生条件(通常为疏水性)和与水溶性的 CE 缓冲液的相容性,且衍生反应完全,所以是目前应用最广泛的衍生方法。不足之处主要在于:溶解细胞法中,反应溶液及过量试剂会稀释细胞内组分;同一组分发生多重衍生,干扰组分的鉴定与定量。

溶解细胞法是在 200 nl 以下的微型瓶中将单个细胞破膜和匀浆后进行衍生反应。衍生反应完成后,用电动进样法或流体动力进样法将部分衍生液引入毛细管中进行分离和测定。Sweedler 等[28]采用 4,5-二甲基-1,2-苯二胺(DMPD)柱前衍生法,对 3 种海生软体动物单个神经细胞中的抗坏血酸(AA)及脱氢抗坏血酸(DHA)进行了分析,AA 检出限达 430 zmol,不同神经细胞之间以及不同软体动物之间抗坏血酸总量都有差异。Lillard 等[29]采用 CE-LIF 及 RT-PCR 测定单个前列腺癌细胞(LNCaP)中的基因表达,以溴化乙锭柱前标记基因表达产物 DNA。Kehr 等[30]采用 FITC 柱前衍生法检测南瓜叶叶肉单个细胞中氨基酸,检出限达到 fmol 级。

完整活细胞法是使衍生试剂透过细胞膜直接进入细胞内与待测物质发生衍生反应,然后将单个细胞吸入毛细管内,在柱上溶膜后,再进行电泳分离。该法可克服反应溶液及过量试剂对细胞内组分的稀释作用。Zare 研究组[31]采用 NDA 柱前完整活细胞衍生法检测了单个鼠神经细胞瘤(NG108-15)中谷胱甘肽。Malek 等[32]检测单个鼠细胞(R2C)中黄体酮时,当细胞在丹酰肼衍生试剂中于室温黑暗处培养 30 min 后,取单个细胞进样分析,丹磺酰化的黄体酮检出限达到 amol 级。

(2) 柱上衍生

柱上衍生将毛细管进样端作为衍生反应器,包括两种模式:①将单个细胞引入毛细管内,然后采用电迁移或压力进样移入细胞溶膜剂及衍生试剂,以进样端为衍生反应器,静止溶膜并反应一段时间后再把进样端移回操作缓冲液中进行电泳分离检测;②将细胞溶膜剂、衍生试剂加入操作缓冲液中,当单个细胞进入分离毛细管后,进行电泳分离检测,细胞在柱内迁移的过程中溶膜衍生。与柱前溶解细胞法相比,柱上衍生可减少样品稀释倍数,操作步骤也得到简化。Dovichi 研究组[33]采用柱上衍生方式,以 FQCA 衍生试剂,对单个线虫单细胞胚胎及单个人结肠腺癌

细胞 HT29 中蛋白质进行了分析。2003 年,他们采用相同衍生方式及非胶毛细管电泳,对单个 HT29 中细胞周期依赖性蛋白质指纹进行了研究,结果表明细胞间在蛋白质表达方面存在巨大差异,而产生这一差异的主要原因在于细胞所处的时相不同[34]。

若衍生试剂不发射荧光,也可将荧光染料加在 CE 缓冲液中,电泳时发生衍生反应。Lillard等[35]将荧光染料 SYBR Green I 或 SYBR Gold 加入 CE 缓冲液,然后将单个中国仓鼠(*Cricetulus griseus*)卵巢细胞 CHO-K1 引入毛细管,再引进少量 SDS 溶解细胞,电泳分离,则细胞中 RNA 被 SYBR Green I 或 SYBR Gold 标记而得到检测。他们又采用这种柱上衍生方式,以溴化乙锭为荧光标记物,对单个 CHO-K1 细胞中的 RNA 进行了检测[36]。

(3) 柱后衍生

柱前及柱上衍生存在的主要问题是分析物的多重标记使电泳峰的鉴定与定量均较困难。柱后衍生可以克服此缺陷,但要求衍生反应必须快速,因为检测信号是衍生反应速度的函数。Feltus 等[37]将两根小内径毛细管同轴相连,制成柱后反应器并采用相似的同轴柱后反应器,用链霉抗生物素蛋白-荧光素异硫氰酸盐(Streptavidin-FITC)柱后衍生生物素(biotin)测定了海生动物单个卵母细胞吸收的生物素。结果表明生物胞素(biocytin)是卵母细胞中生物素的主要存在形式,细胞间的生物胞素浓度有明显差异(0.48～5.13 μmol · L^{-1})。

2. 电化学法

安培法由于可使用细内径毛细管、进样量小、灵敏度不会随着检测器装置的小型化而损失、选择性好、线性范围宽,适用于细胞内的无机离子、有机小分子、氨基酸及糖等化学物质的检测,在单细胞分析中应用较广。Ewing 等[38]首次将 CE-安培法用于单细胞分析,并对单个神经细胞中的神经递质开展了大量研究工作。程介克等[39]采用 CE-安培法检测单个鼠交感神经细胞中去甲肾上腺素和肾上腺素,检出限分别达到 57 amol 和 59 amol。

金文睿等[5, 13～15, 40～44]采用 CZE/柱端安培法,对直径 30 μm 以下的单个细胞组分进行了系统研究。以碳纤维微盘捆绑电极为工作电极,用 NDA 柱内衍生,分别对单个鼠腹膜巨噬细胞中 6 种氨基酸[41]和单个人淋巴细胞中 4 种氨基酸[5]进行了检测。他们还采用完整活细胞 NDA 柱前衍生安培法(电穿孔技术将衍生试剂 NDA 导入细胞),对单个人红细胞中 6 种氨基酸进行了检测[14]。碳纤维微盘捆绑电极还被用于单个人中性白细胞中抗坏血酸[43]及单个鼠腹膜肥大细胞中组胺[13]的测定。采用碳纤维阵列微电极,检测单个人红细胞中非甾体药物双氯酚酸钠(电穿孔导入),10 个细胞中药物平均浓度为 4.21 μmol · L^{-1}(RSD=10 %)[42]。采用金/汞微电极,分别测定单个人红细胞和单个鼠腹膜巨噬细胞中谷胱甘肽,检

出限达到 26 amol[40,15]。他们还采用碳纤维捆绑-金/汞双电极系统同时测定了单个鼠肝细胞中的色氨酸和谷胱甘肽[44]。

扫描伏安法检测也被用于单细胞 CE 分析，除可提供电泳过程中电流随时间的变化信息外，还能得到被测物质的电流随电压变化的伏安特性，这有助于混合物中各化合物的鉴别。Ewing 等[45]用 CE-扫描伏安法对单个神经细胞中多巴胺进行了鉴别及检测。

3. 质谱法

质谱法(MS)可提供分子结构信息直接鉴定细胞内组分。近年来，MS 在单细胞 CE 分析中的应用逐渐增多。Smith 等[46]首次将 CE-MS 用于单细胞分析，采用电喷雾离子化-傅里叶转换离子-回旋加速共振质谱法(ESI-FTI-CR-MS)检测单个人红细胞中血红蛋白，血红蛋白的 α 和 β 两条珠蛋白链仅得到一个电泳峰，而质谱图显示有两条链存在。Cao 等[47]采用相似的 CE 分离条件及电喷雾离子化-飞行时间质谱(ESI-TOF-MS)，将单个人红细胞中血红蛋白的 α 和 β 两条珠蛋白链部分分离，但未检测出低含量的碳酸酐酶。Moini 等[48]用毛细管电泳-电喷雾离子化质谱(CE-ESI-MS)对单个人红细胞中碳酸酐酶和血红蛋白同时进行了检测，碳酸酐酶Ⅰ和碳酸酐酶Ⅱ的检出限约分别为 20 amol 和 44 amol。

Sweedler 研究组[49]最近发展了一种离线 CE-MALDI-TOF-MS(基体辅助激光解吸离子化飞行时间质谱)分析系统。CE 洗脱液沉积于直接用作 MALDI 样品靶的平面上，从各样品靶取样进行 MS 检测。此法用于检测海生软体动物单个神经细胞中神经多肽，得到一个很清晰的多肽质谱峰。该研究组还将 MALDI-TOF-MS 和放射性核素检测法联合作为 CE 离线检测方法，应用于单个神经细胞中神经多肽和激素的分析，可提供 zmol 级检出限的定量信息[50]。

4. 紫外吸收光谱法

由于紫外吸收光谱法(UV)灵敏度较低，CE-UV 在单细胞分析中的应用主要限于体积较大的神经细胞、卵母细胞及植物细胞，所用分离毛细管内径也较大，多为 75 μm 和 50 μm。Cruz 等[51]采用 CE-直接 UV 检测单个神经细胞中 NO_2^- 和 NO_3^-，检出限均小于 200 fmol，细胞间的 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度差异较大。Bächmann 研究组[52]采用 CE-间接 UV 对小麦叶单个表皮细胞中多种无机阴、阳离子进行了检测，还采用 CE-直接 UV 测定了烟草叶单个表皮细胞中的烟碱、异烟碱和新烟碱[53]。

5. 免疫法

Rosenzwig 等[54]提出一种毛细管电泳的在柱微型免疫检测方法。电泳毛细管内填充与抗体共价键合的胶体颗粒，在高压电场的作用下胶体颗粒发生迁移，利

用抗原分子与抗体专一性结合作用和激光光散射检测反应颗粒的个数，检测限达1 zmol(约 620 个分子)，测得人单个红血球细胞中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)的平均含量为34 zmol。Tan 等[55]还设计组装了经毛细管电泳分离后，用粒子计数免疫检测法测 G6PDH 的含量，激光荧光法测 G6PDH 活性的装置，可同时测定人单个红细胞中 G6PDH 的量和活性。红血球细胞分析结果，每个细胞中 G6PDH 平均含量为(15±9)zmol，活性(27±14)pIU。

6. 放射法

Sweedler 研究组[56]报道了一种柱后放射性检测装置，用^{35}S、^{32}P或^{3}H标记蛋氨酸，经毛细管电泳分离，柱后将毛细管流出液收集在可键合肽的膜上，用电荷耦合器(CCD)检测器阵列检测斑点，获得电泳谱图。该方法灵敏度高，已用于海生软体动物单个脑神经细胞 B_1 中神经肽的检测。

7. 单细胞生物传感器检测法

Allbritton 研究组[57]设计了一种单细胞生物传感器用于检测单个蟾蜍卵母细胞中 1，4，5-三磷酸肌醇(IP_3，Ca^{2+} 释放第二信使)。这种检测器包含一个载有 Ca^{2+} 指示剂染料(mag-fura)的细胞(PC12 或 BHK221)，细胞膜被洋地黄皂苷穿透形成许多小孔。被 CE 分离的 IP_3 从毛细管出口端经细胞膜小孔进入检测器细胞，促使内质网中 Ca^{2+} 释放，而 Ca^{2+} 量的减少又引起细胞中 mag-fura 的荧光强度增加，因此检测器细胞中 mag-fura 的荧光强度可反映 IP_3 含量。测得单个卵母细胞平均含 IP_3(40±10)$nmol \cdot L^{-1}$，经溶血磷脂酸刺激后的单个卵母细胞中 IP_3 在 40 $nmol \cdot L^{-1}$～2 $\mu mol \cdot L^{-1}$范围。该法检测单个卵母细胞中 IP_3 的灵敏度比其他所有检测方法的灵敏度高一万多倍。

14.1.5　细胞毛细管电泳分析展望

毛细管电泳作为微分离技术在细胞样品分析中的应用日益广泛，除了前述的几个方面外，还应用于细胞内的氨基酸、维生素、肽类等内源性物质的检测，并有采用β-环糊精手性选择剂分离单神经细胞中的天冬氨酸对映体的报道。与传统的细胞分析相比，CE 定量更为准确快速，可以分析细胞的化学组成及分离细胞内手性物质。单细胞 CE 分析在进样技术、检测方法、应用范围等方面都已取得重大进展，但要应用于实际领域，还有以下问题尚待研究解决：①发展自动化程度高、适用范围宽的单细胞进样技术。进一步微型化细胞质进样器，用于小体积细胞的细胞质进样。建立 CE 与流式细胞仪的适当接口，从根本上解决单个全细胞进样的自动化问题。②发展阵列或多通道单细胞 CE 分析系统，并与单个细胞自动化进样技术相结合。只有这样，才能在短时间内分析数以百万计的细胞，从这众多细胞中

或许能发现1个病变细胞。③深入研究检测技术，扩大分析物范围。寻求更多、反应更灵敏的衍生试剂及衍生方式，充分展示LIF和电子捕获检测器（ECD）的高灵敏检测优势；大力发展质谱法；进一步发展单细胞生物传感器，使更多信号分子被检测。④进一步向生物学、医学等领域渗透。更加关注细胞生物功能，研究细胞内化学组分的微小变化与细胞生物功能变化之间的相互关系。⑤分析对象将逐渐从细胞内源性组分向外源性组分特别是药物扩展。在细胞水平上研究药物分子与细胞受体的结合等相互作用、受体蛋白质量与抗药或耐药性的关系等。这些有助于了解细胞水平的生命变化及药物的作用方式，设计、改造或者筛选更有效的药物等都可能成为今后单细胞毛细管电泳分析的研究热点。

14.2 细胞图像分析

14.2.1 光学显微镜

由于荧光标记技术和显微技术的发展，光学显微镜已经广泛应用于活细胞成像以及观察活细胞的动力学过程。2003年，“*Science*”出版了一册专集，对光学显微镜用于活细胞成像进行了广泛和详细的评述[58～62]。

当选择活细胞成像技术时，需要考虑3个因素：检测灵敏度、检测速度以及样品细胞的存活能力。与观察固定样品相比，活细胞成像要在尽可能得到高信噪比图像的同时减少对样品的损害。另外还需要考虑样品的厚度、观察过程持续的时间、使用几个不同的波长成像、样品的明亮程度、是否需要透射光成像、是否要采用光漂白等特殊技术等。事实上，任一种成像技术都不可能达到所有观察要求，要综合各种因素进行选择。

由于光漂白会伤害细胞，所以为减少成像过程中对细胞的损害，要尽一切可能短时间的将细胞暴露于光和空气中，降低激发强度。比如，当不需要的时候，一定要关掉光源；尽可能去掉不需要的波长的光，而不能简单依赖于激发滤光器；降低氧气浓度或加入抗氧剂以减少自由基的产生，降低光漂白程度；尽量去除介质中的酚红和血清，减小背景荧光。

成像系统要最大限度地利用光，在光路中尽可能减少光学元件。相机的灵敏度对成像效果有至关重要的作用，因为检测器灵敏度越高，需要的照射强度越低。使用加强相机或CCD相机可以提高灵敏度。

获取数据的速度在活细胞成像中也是一个需要考虑的重要因素。激光线、滤光器以及单色器的输出转换是减慢获取数据速度的重要原因。基于单色器的系统可以在激发波长之间快速转换（一般小于3 ms），但是由于光纤和显微镜连接，照射强度较低。滤光器轮的构造使它具有较高的光通量，但是转换速度慢。如果仅对小面积样品成像，则传统的扫描共聚焦显微镜对快速成像已经有足够的数据获

取速度。若需对神经网络活动等非常快的过程进行成像，可以用共振检流计进行快速扫描。

通过共聚焦系统可以方便的得到高分辨率 3D 图像(图 14.3)，但是对于很多实验，特别是活细胞实验，用传统的广视野系统，并对数据进行去卷积处理可以得到更好的结果。广视野显微镜收集各个焦点平面的光，一个无限小的点光源对一定距离处的焦平面的贡献由物镜的点传播函数(point spread function，PSF)决定。通过去卷积处理，PSF 可以将焦点外的光反推出其点光源。这个技术在细胞成像，特别是在观察弱荧光结构上已经取得了巨大成功，用双处理器电脑已可以在数分钟内对大规模 4D 数据进行去卷积处理。

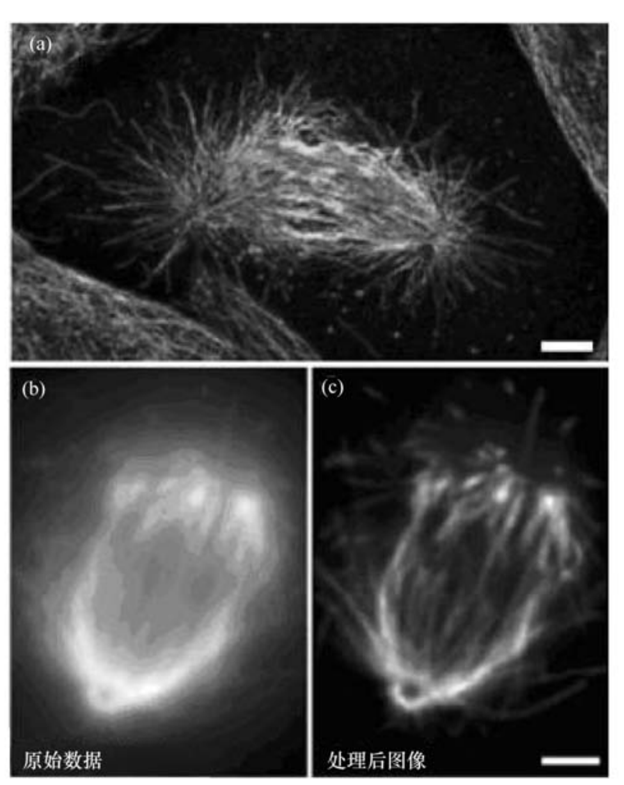


图 14.3　共聚焦激光扫描显微镜 DLDI 细胞中有丝分裂纺锤体三维图像[58]

1. 明场显微镜

在众多显微技术中，荧光显微镜是最常用的研究活细胞内动力学过程的方法，但采用透射光技术的明场显微镜也是一种非常有用的技术，常与荧光显微镜配合

使用来提供细胞形态、位置、运动方面的信息，这对观察细胞凋亡过程中的形态变化有非常重要的意义，而不再仅仅是作用荧光成像的辅助工具。

最常用的是相差显微镜和微分相衬干涉显微镜(differential interference contrastmicroscopy,DIC)，又称 Normarski 显微镜。DIC 是基于偏振光干涉的光学干涉系统，具有纳米级的分辨率。在 3D 图像分析软件的辅助下，细胞的各个不同部位，如细胞表面、细胞质或细胞核可以分别被计算，从而精确重构细胞的三维立体图像。

2. 一般荧光显微镜

细胞中只有少数物质有天然荧光。哺乳动物细胞中主要是吡啶核苷(NADH,NADPH，最大吸收光谱 340 nm，荧光发射光谱 460 nm)和黄素蛋白(FAD,FMN，最大吸收光谱 450 nm，荧光发射光谱 515 nm)；植物细胞中，木质素具有绿色荧光。细胞色素、过氧化酶、血红素、肌球素和叶绿素等，即含有蛋白质的血红素能发强红色荧光。一般情况下，都需要引入荧光染料使待测物产生荧光，获得荧光图像。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的出现给活细胞成像技术带来一场革命，原因是一种具有自发荧光的分子可通过基因工程编码的方法与被分析的样品中的 cDNA 融合，且融合蛋白不影响原有蛋白的细胞定位和细胞活性。GFP 和红色荧光蛋白的光谱可使多色活体细胞图像分析成为可能[59]。利用基因突变技术可以获得若干 GFP 的突变体：增强绿色荧光蛋白(EGFP)、增强蓝色荧光蛋白(EBFP)、增强青色荧光蛋白(ECFP)以及增强黄色荧光蛋白(EYFP)[63]。

荧光显微镜用于单细胞成像已有不少报道。Yeung[64]等用 Zeiss 倒置荧光显微镜配置紫外氩离子激光器(305 nm)及 CCD 检测器获得鼠单个活神经胶质细胞中神经递质 5-羟色胺天然荧光图像。Walt 等[65]采用高密度微室芯片，将成千个酵母细胞分别置于直径 6 μm 微室中，用 5 种不同荧光染料染色，通过 CCD 阵列检测器获得单个活细胞荧光阵列图像(图 14.4)，分析效率得到显著提高，可用于细胞生物学、疾病早期诊断及药物筛选研究。程介克研究组采用配置高分辨数码相机(3900×3900 像素，AxioCam HR,Zeiss)的倒置荧光显微镜(200 M,Zeiss)，用萘二甲醛(NDA)荧光染料标记单个神经癌细胞(PC12)中神经递质多巴胺，观察到荧光强度较大的亮点，显示多巴胺囊泡分布的不均匀性，比增强型 ICCD(1024×1024 像素，Princeton，美国)所得图像清晰[63]。Bedioui[66]等将电化学检测和荧光检测结合起来在光透明电解池中同时检测细胞内外的 NO 浓度。其中，以 DAF-2 为探针检测细胞内 NO 浓度，而用化学修饰电极检测细胞外 NO 浓度，两个检测系统之间无干扰，响应时间为数十秒。

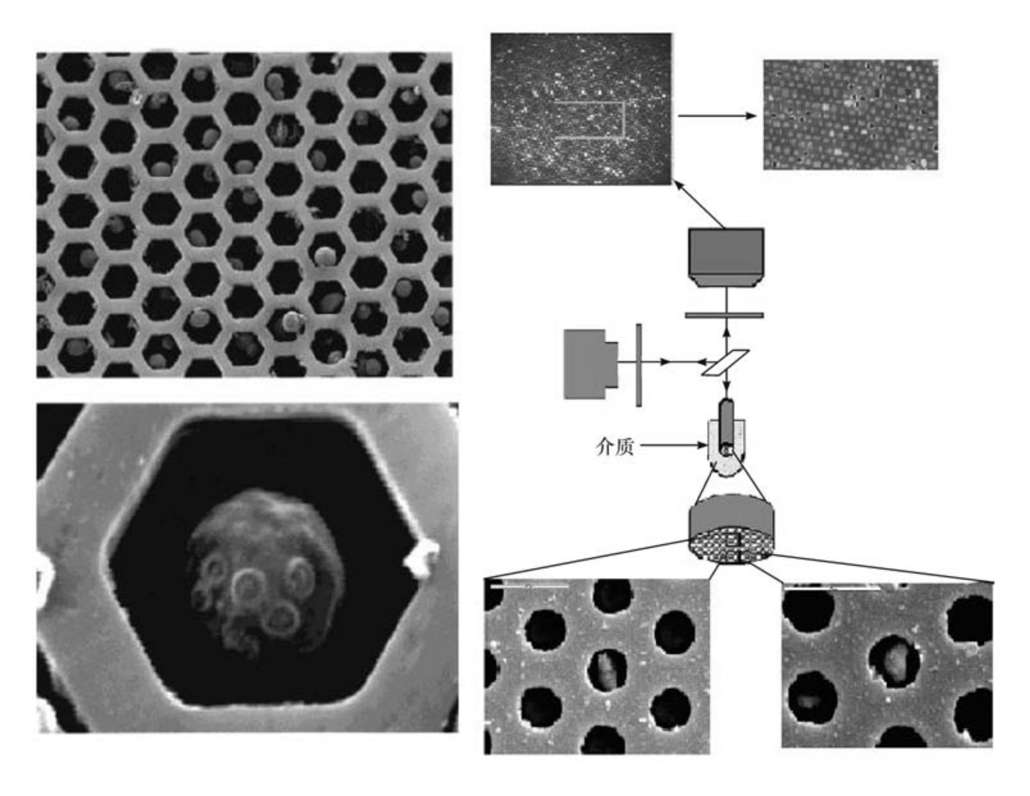


图 14.4　高密度单细胞分析芯片及荧光成像系统[65]

量子点(quantum dot,QD)即半径小于或接近激子玻尔半径的半导体纳米粒晶,因其具有宽的激发光谱和窄而对称的发射光谱,用单一波长的光可同时激发不同尺寸量子点而获得不同颜色的发射光,克服了光漂白现象而成为一类新型探针标记物,并被广泛应用于单细胞研究中,如:①单细胞的单色或多色荧光标记与成像;②单细胞中蛋白质、核酸的分析和检测。Debertret 等[67]将 CdSe-ZnS(直径 3.5 nm)量子点包入磷脂胶束中,观察了量子点进入非洲蟾蜍胚胎细胞内不同层次的荧光成像(图 14.5)。

3. 激光扫描共聚焦显微镜

传统的荧光显微镜使用场光源,因标本邻近结构(细胞或亚细胞结构)产生的衍射光和散射光的干扰,使标本中细微结构的成像不够清晰。在科学研究工作对更高图像分辨率的追求的前提下,激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser-scanning microscope,CLSM)应运而生。1957 年,Marvin Minsky 申请了激光扫描共聚焦显微镜的发明专利,但直到 1987 年该仪器才开始真正商业化生产。与传统光学显

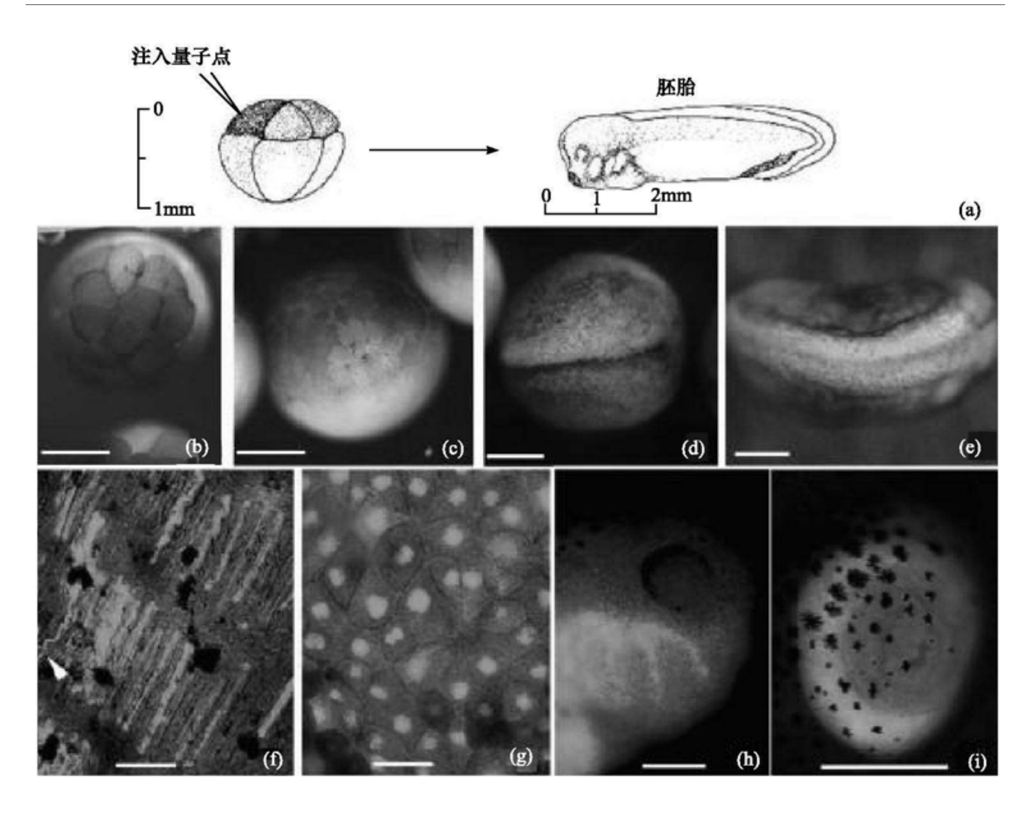


图 14.5　CdSe-ZnS 量子点胶束标记非洲蟾蜍胚胎细胞荧光图像[67]

微镜相比，它解决了生物样品结构相互重叠影响观察的问题，并可形成清晰的三维图像。所以自从问世以来，它在生物学的研究领域中就得到了广泛应用。

1）激光扫描共聚焦显微镜的基本原理

激光扫描共聚焦显微镜是采用激光作为光源，在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦原理和装置，并利用计算机对所观察的对象进行数字图像处理的一套观察、分析和输出系统。主要系统包括激光光源、自动显微镜、扫描模块(包括共聚焦光路通道和针孔、扫描镜、检测器)、数字信号处理器、计算机以及图像输出设备(显示器、彩色打印机)等。通过激光扫描共聚焦显微镜，可以对观察样品进行断层扫描和成像。它的主要原理是利用激光扫描束通过光栅针孔形成点光源，在荧光标记标本的焦平面上逐点扫描，采集点的光信号通过探测针孔到达光电倍增管(PMT)，再经过信号处理，在计算机监视屏上形成图像(图 14.6)。由于激光光源的光栅针孔和探测针孔对物镜焦平面是共轭的，焦平面上的点同时聚焦于光栅针孔和探测针孔，进行点扫描时，扫描点以外的点不会成像，经逐点扫描后才形成整个标本的光学切片。因此，可以无损伤的观察和分析细胞的三维空间结构。同时，激光扫描共聚焦显微镜也

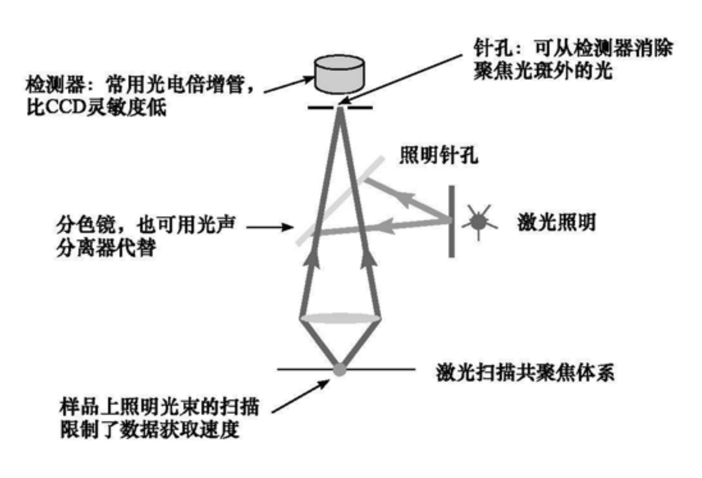


图 14.6　激光扫描共聚焦显微镜原理图[58]

是活细胞的动态观察、多重免疫荧光标记观察和离子荧光标记观察的有力工具[68]。

在对生物样品的观察中，激光共聚焦显微镜有如下优越性：①对活细胞、组织或细胞切片进行连续扫描，可获得精细的细胞骨架、染色体、细胞器和细胞膜系统的三维图像。②细胞内离子荧光标记，利用单标记或多标记，检测细胞内如 pH 和钠、钙、镁等离子浓度的比率及动态变化。③荧光标记探头标记的活细胞或切片标本的活细胞生物物质，膜标记、免疫物质、免疫反应、受体或配体、核酸等观察；可以在同一张样品上进行同时多重物质标记，同时观察。④对细胞检测无损伤，具精确、准确、可靠和优良重复性，数据图像可及时输出或长期储存[68]。

2）激光扫描共聚焦显微镜的主要生物学应用[68]

激光共聚焦显微镜适用于细胞生物学、细胞生理学、神经生物学和神经生理学等几乎所有涉及细胞研究的医学和生物研究领域。主要包括以下几方面的应用：①组织和细胞中荧光标记的分子或结构的定位、定量分析；② Ca^{2+}、pH 及其他细胞内离子浓度及变化的实时定量测定；③三维图像重建；④荧光光漂白恢复技术；⑤长时程观察细胞迁移和生长。

Zare 等[69]在激光共聚焦显微镜下，用光钳操纵单个人工合成磷脂囊泡（直径 1～5 μm，体积 fl 至 zl），在两个囊泡中，一个含钙离子，另一个含 fluo-3 钙荧光试剂。用电脉冲将两囊泡融合后，产生荧光响应，在荧光显微镜下荧光强度提高 40 倍。Song[70]等采用共聚焦相关成像技术及绿色荧光蛋白标记技术，发现新生鼠鼠脑中海马区星形神经细胞能刺激成年鼠脑中干细胞产生新神经元，使神经元生长速度提高 8 倍。Arriaga 等[71]用共聚焦荧光成像技术研究了次微米荧光染料微球被单个鼠骨髓瘤细胞（NS-1）吞噬后的空间分布。Kennedy[72]等应用共聚焦激光扫描显微镜（Nikon RCM 8000）和荧光染料 FluoZin-3 对单个鼠胰腺 β-细胞释放

成像，发现 FluoZin-3 对 Zn^{2+} 有较高的选择性和灵敏度，且荧光背景低(图 14.7)。

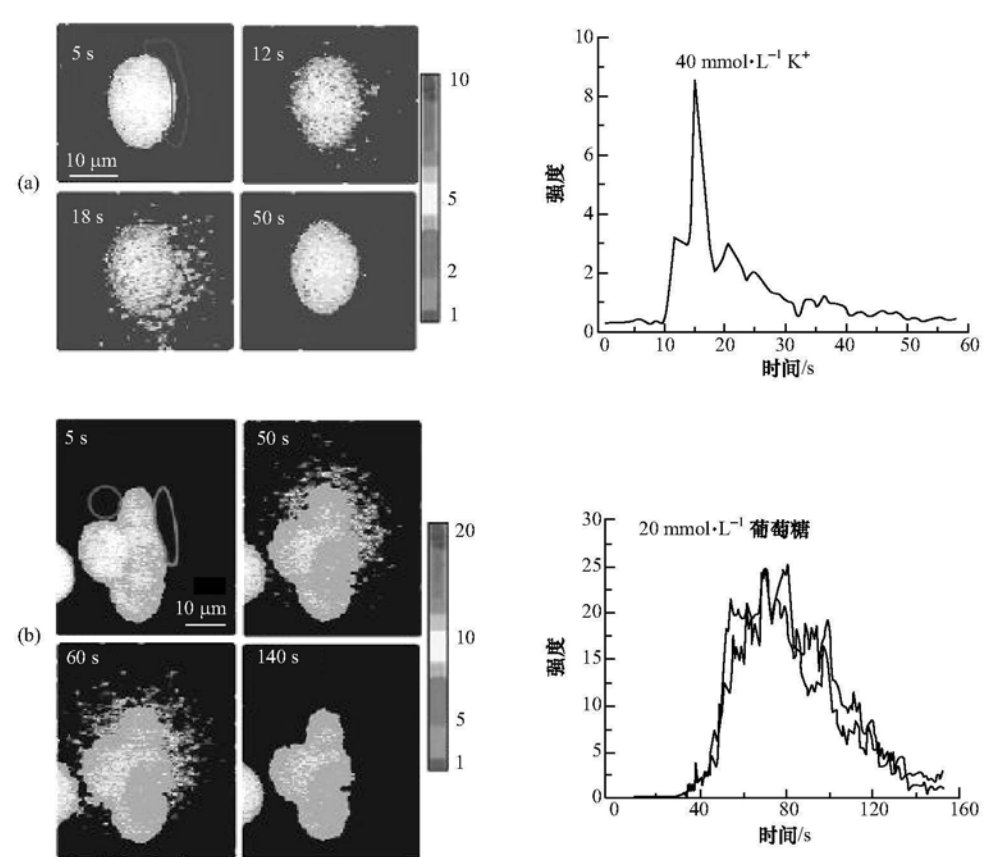


图 14.7 单个鼠胰腺 β-细胞释放 Zn^{2+} 图像[72]

(a) 40 m mol · $L^{-1}K^{+}$ 诱导的单个细胞的 Zn^{2+} 释放；(b) 20 m mol · L^{-1} 葡萄糖诱导的四个细胞的 Zn^{2+} 释放

荧光光漂白恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching，FRAP)是一种非常有用的显微荧光分析技术，特别适合于多种生物膜系统的分子迁移研究。它是将待测细胞从表面用荧光物标记，利用高能量激光束将细胞内某一部分中选定靶区域的某种荧光淬灭，然后观察邻近相同的荧光标记物重新扩散入该区域的速度和方式，从而分析细胞内蛋白质运输、受体在细胞膜上的流动和大分子组装等细胞生物学过程。若将 FRAP 技术与激光共聚焦扫描显微镜联用则可以精确的选择光漂白区域，减少对样品活性的损伤，使分析结果量化程度更高。

4. 多光子荧光显微镜

1990 年，Webb 采用双光子激发荧光系统，建立了双光子激光扫描荧光显微镜

(two-photo laser scanning fluorescence microscopy)。双光子效应就是使荧光团吸收两个光子，而不是一个光子，在飞秒数量级的时间内被激发，这样就可以使用更长波长的激发光，使观察深度更深，并且避免了光漂白的发生。多光子显微镜则是通过对试样照射高密度的光，使通常只吸收一个光子的电子能吸收两个以上的光子而产生荧光，以此实施观察。

由于采用多光子激发，荧光分子所需能量低，约为单光子激发所需能量的一半，因此，可采用红外和近红外激发。为了快速而实时地观察试样，采用了快速扫描微透镜阵列，仅用 3 ms 便可获取一张图像。这样，不仅激光照射的时间极短，且与连续振荡激光相比，光子吸收几率大幅度提高，可对试样进行实时无损观察。

多光子激发仅在焦点附近极小范围，三维成像力强，可进行活体原位成像分析，观察肿瘤癌变图像。Bousso 等[73]用双光子荧光显微镜观察胸腺细胞间反应动力学。Trachtenberg 等[74]用绿色荧光蛋白标记活鼠，用双光子荧光显微镜观察鼠大脑皮层单个神经元脊柱的变化，发现经过一周的时间，神经元中有一些脊柱生长或消失，图像中脊柱的变化(图 14.8)显示相应神经元连接的重建，也表示大脑皮层能形成新的突触传递神经信号。Grutzendler 等[75]也同时采用双光子荧光显微镜成像的方法，研究了活鼠大脑皮层中树突脊柱的长期稳定性。



图 14.8　活鼠大脑皮层中突触长时间双光子荧光显微镜图像[74]

5. 全内反射荧光显微镜

全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscopy，TIRFM)基于全内反射荧光检测的显微技术，是一种跟踪单细胞内物质运动过程的有力手段。当激发光通过高反射系数的玻璃到低反射系数的细胞时，仅观察到一定反射角度的反射光。进入低反射系数细胞的激发光迅速衰减，激发光仅深入到距细胞表面 100 nm。因此，仅能观察到细胞膜荧光图像。采用 TIRFM 可以显著降低背景信号，已获得单个活细胞中细胞膜上单分子图像，被誉为近代最激动人心的发展之一[76]。

现已采用 Cy3 荧光染料标记表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF，为小肽激素，可诱导细胞增殖)，采用全内反射荧光显微镜获得人表皮细胞(A431)膜上 EGF 的单分子图像，用于研究 EGF 受体信号传导。Wu 等[77]通过用 EGFP hpNPY 融合荧光蛋白标记 PC12 细胞的致密大囊泡，用全内反射荧光显微镜观察

单个囊泡及活的 PC12 细胞中单个囊泡的转运、锚定及与细胞膜的融合过程。目前已有商品化仪器,但要求熟练的技巧及复杂的数据处理。

6. 荧光寿命图像显微镜

检测荧光探针的一般方法都是通过计算激发态的荧光团发射的光子数,另外一个方法是用荧光寿命图像显微镜(fluorescence lifetime imaging,FLIM)来测量荧光团位于激发态的寿命[78]。FLIM 为检测活细胞中多个荧光团提供了一种方法,对于具有不同荧光寿命的 GFP 的突变体等光谱相关分子,不受光谱重叠的影响[79]。FLIM 是一种测量荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy trancfer,FRET)的非常突出的方法,因为当 FRET 发生时,激发态的荧光寿命显著降低。荧光寿命图像显微镜已用于活细胞中 pH 及酶活性图像分析,最近被用于激酶活化成像[80]。但是这个方法也存在如下一些缺点:分辨率有限;用于活细胞研究非常困难;缺乏数据分析技术。

Sauer 研究组[81]近几年对荧光寿命图像显微镜进行了一系列研究,采用单脉冲光二极管激光器(635 nm)激发的共聚焦光谱分辨荧光寿命显微镜,检测及鉴定单个鼠成纤维活细胞(3T3)中单 mRNA 分子(图 14.9)。这一新技术可用于研究活细胞中复杂的分子反应。

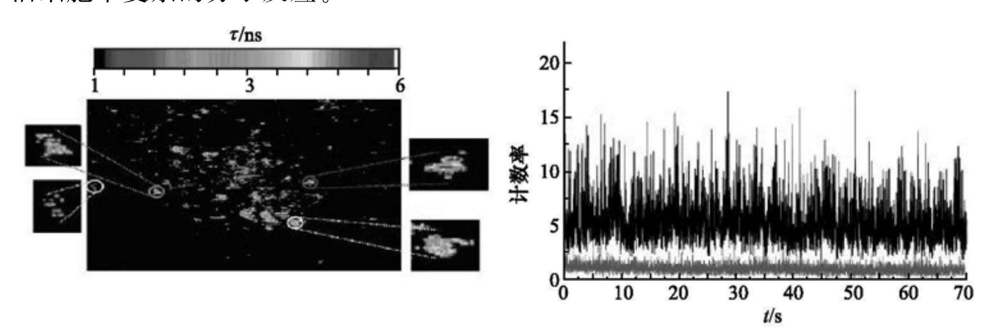


图 14.9　鼠成纤维细胞(3T3)荧光图像

7. 近场扫描光学显微镜

近场扫描光学显微镜(near-field scanning optical microscopy,NSOM)可以突破光学显微镜分辨率受限于半波长的瓶颈,在光学显微镜中具有独特的性能。普通光学显微镜由于光衍射作用,空间分辨率为使用波长的一半,在单细胞分析中无法深入到 nm 级。NSOM 将试样置于离光源极近的位置[所以称为近场(near-field)],不受衍射光限制,分辨率达 15 nm,已经应用于人红细胞、人染色体及大肠杆菌等的图像分析[58]。图 14.10[82]形貌图中大肠杆菌约 2 μm 长、1 μm 宽、0.5 μm 厚。NSOM 不仅其空间高分辨率是其他光学显微镜望尘莫及的,而且其灵敏

度可达单分子水平,但这仅对很柔软样品获得有限的成功。将荧光图像分析与SNOM结合应用到活体细胞成像的技术正在发展中。

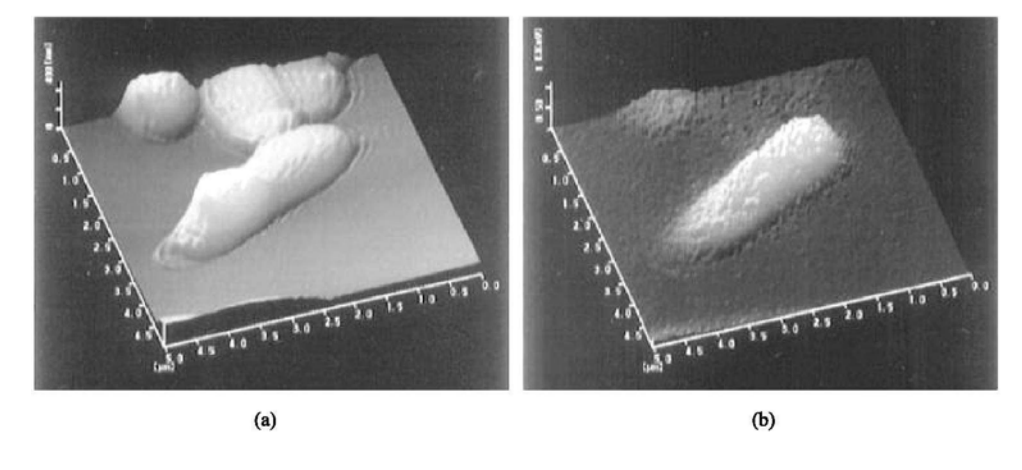


图 14.10　含绿色荧光蛋白的大肠杆菌局部形貌及近场荧光图像[82]

(a)局部形貌图;(b)近场荧光图像

8. 荧光相关光谱显微镜

激光诱导荧光是目前最灵敏的荧光检测方法,影响激光诱导荧光检测灵敏度的主要因素来自瑞利和拉曼散射。荧光相关光谱显微镜(fluorescence correlation spectroscopy,FCS)通过利用激光共焦技术减少样品照射体积,抑制散射光影响,从而实现单分子检测。该方法是通过测定溶液中微区内(通常$<10^{-15}$ L)发光粒子由于布朗运动或化学反应而产生的荧光涨落现象(荧光强度的明暗变化),并对荧光强度随时间变化函数做分析,以测量细胞内局部浓度、分子扩散、分子间反应过程图像。

单光子自相关是荧光相关光谱最常用的方法,但是采用单光子激发时,很多生物分子在短波长激光照射下会发生光漂白(photobleaching)。因此近几年又发展了双光子激发技术,目前已在荧光相关光谱的研究中发挥了重要作用。荧光分子在很短的时间间隔里(10^{-15} s)吸收两个相同频率的光子后被激发到高能级,经过一个弛豫过程后发生自发跃迁,辐射出频率略低于两倍入射光频率的荧光光子。双光子激发要求激光器不仅具有高的输出功率,还要求其为脉冲激发形式,以便在每个脉冲下能获得高的光子密度。双光子激发多采用红光或近红外光,这使其特别适用于细胞分析,因为细胞在该波长区光损伤小、自荧光较少。该方法的局限在于目前对不同染料的双光子激发光谱测定十分困难,而且超快脉冲激光系统十分昂贵。自相关光谱比较的是信号随时间变化的自相似度。虽然自相关分析在很多方面已取得成功,但为了测定样品中不同物质的扩散性质,还必须完成很多测量,如果这些性质十分相似,分析将十分困难。为了克服这些困难,Eigen 等[83]提出了

荧光互相关光谱设想,由 Schwille 等[84]首先在实验中实现。样本采用两个不同的荧光团(如 Cy5 和罗丹明绿)标记,并用两条不同波长的激光束激发,各自的发射荧光用两个独立的检测器检测,只有同时标记两种染料的分子才能被互相关。该方法可消除检测器引入的噪声,并提高检测特异性。荧光互相关光谱已得到广泛应用。

由于绝大多数物质都不具有荧光特性,因此荧光相关光谱前期的一个主要工作是对分析物衍生化。荧光相关光谱用于活细胞分析,主要在细胞膜和细胞内两方面。细胞膜在细胞研究中有很重要作用,因其自荧光很小,脂质双分子层很薄(约 4 nm),比 FCS 观察区轴向半径小 3 个数量级,数据可按二维模型处理,因此 FCS 特别适合细胞膜的研究。Pramanik 等在这方面做了较深入的工作,研究了胰岛素原 C2 肽与几种人细胞膜的相互作用,发现了一个 C2 肽的受体;他们还研究了培养细胞中表皮增长因子与膜结合受体的特异性结合[85]以及胰岛素与人肾小管细胞膜的结合作用,指出人肾小管细胞膜对胰岛素有两种亲和性不同的结合位点[86];另外他们还研究了神经肽(谷胱甘肽)在胰腺癌细胞膜上的结合作用,得出在该细胞上存在有两种谷胱甘肽受体[87]。

细胞内荧光相关光谱研究极具挑战性,因为细胞内自荧光、光漂白和荧光闪烁等均影响测定结果,其中自荧光主要来源于细胞线粒体中的 NADH 和黄素蛋白。采用双光子激发可以有效消除这些影响。Wachsmuth 等[88]研究了绿色荧光蛋白变异种 EGFP 和 EGFP-β-半乳糖苷酶融合蛋白(fusion protein)在活细胞内的扩散。Schwille 等[89]对 FCS 在细胞内的分子动力学研究及神经科学研究中的应用做了评述。

14.2.2 扫描电化学显微镜

1. 扫描电化学显微镜

1986 年,Bard 小组在使用扫描隧道显微镜(scanning tunnel microscope, STM)首次进行溶液中导体表面研究时,为了弥补 STM 不能提供电化学信息的不足,明确提出了扫描电化学显微镜(scanning electrochemical microscopy, SECM)的概念[90],并于 1989 年发展了一种新型的扫描探针显微镜(scanning probe microscope, SPM)技术——扫描电化学显微镜[91]。扫描电化学探针显微镜是一种分辨率介于光学显微镜(optical microscope, OM)与扫描隧道显微镜之间的电化学原位新技术。SECM 使用的探头是微电极,具有化学选择性,与扫描隧道显微镜和原子力显微镜(atom force microscope AFM)技术不同,SECM 基于电化学原理工作[91,92],可测量微区内物质氧化或还原所给出的电化学电流,研究探头和基底(基底可以是金属、半导体、导电聚合物膜、含有氧化还原物质的溶液以及固定化酶等)上的异相反应动力学及探头和基底间溶剂层的均相反应动力学,分辨电极表面微区的电化学不均匀性,给出导体和绝缘体的表面形貌,弥补了 STM 不能直接提

供电活性信息的不足。目前 SECM 可达到的最高分辨率约为几十纳米。

20 世纪 90 年代初，SECM 已经应用于生物体系研究，近几年来，在研究生物膜和单细胞中发挥了越来越大的作用[93]。采用正、负反馈工作模式，可以对各种细胞或单细胞成像，以及在外加刺激下，细胞图像的变化和细胞释放，各种氧化还原物质在细胞膜上的穿透行为和细胞内氧化还原中心与细胞外中介体之间的电荷传递热力学和动力学。采用产生、收集模式可以得到细胞在新陈代谢过程和相关电子传递过程中释放的物质的浓度剖面图。

2. SECM 的工作原理

SECM 是以电化学原理为基础的扫描探针新技术，它具有多种不同的操作模式[94]（图 14.11）。

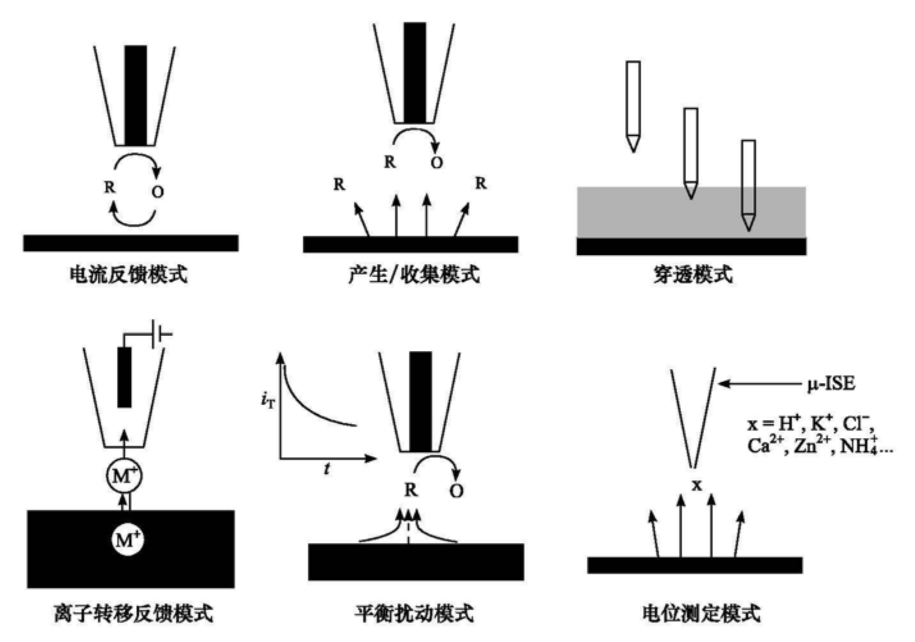


图 14.11　SECM 操作模式示意图[94]

1）电流反馈模式[94]

当探针（常为超微圆盘电极，UMDE）与基底同时浸入含有电活性物质 O 的溶液中，在探针上施加电位 E_T 使 O 发生还原反应，即：O＋ne ⟶ R。当探针靠近导电基底时，因其通常被作为第二工作电极，且其电位控制在 R 氧化电位，则基底产物 O 可扩散回探针表面使探针电流增大，且探针离样品的距离越近，电流就越大。这个过程被称为“正反馈”。当探针靠近绝缘基底表面时，本体溶液中 O 组分向探

针的扩散受到基底的阻碍，故探针电流减小，且越接近样品，电流越小。这个过程常被称作"负反馈"。当探针远离基底时，正负反馈均可忽略，此时微探针电流为常规微电极稳态电流 $i_{T,\infty}$，

$$i_{T,\infty} = 4nFC_o^* D_o a$$

式中，F 为法拉第常数；C_o^* 为 O 的本体浓度；D_o 为 O 的扩散系数；a 为探针电极半径；n 为电极反应转移的电子数。

2）产生/收集模式及电位测量[94]

在产生/收集模式（generation-collection）中，探头和基底都可作为工作电极，其中一个电极发生反应，另一个电极对产物进行收集检测。产生/收集模式可以分为探头产生/基底收集（TG/SC）和基底产生/探头收集（SG/TC）两种模式。

3）穿透模式[94]

在穿透模式（penetration）中，利用非常小的 SECM 探头穿透微结构。例如，可以用 SECM 探头穿透一个含有电活性中介体的几微米厚的高分子膜，获得膜内浓度变化、动力学及热力学的相关信息。当探头穿透膜以后，探头电流会随探头与膜之间距离的变化而变化，与反馈模式极为相似。

4）离子转移反馈模式[94]

离子转移反馈模式（ion transfer）是最近才发展起来的，通过离子转移使探头上产生反馈电流，主要用来研究界面间的离子转移和界面图像。采用这种模式，可以用 SECM 研究许多非电活性物质。

5）平衡扰动模式[94]

平衡扰动模式（equilibrium perturbation）主要是利用探头上的反应快速消耗溶液中的物质从而干扰基底（通常是界面）的平衡状态。在这一过程中，探头电流对溶液平衡的变化非常敏感，例如，可将其应用于吸附/脱附体系及其他动态平衡体系。另外，对于不能或不适于被穿透的微结构，可采用此模式获得相应的信息。

6）电位测定模式（potentiometric detection）[94]

应用离子选择性的超微电极作为 SECM 的探头，可以测量各种离子的浓度变化，利用这种变化引起的电位改变即可获得动力学信息。目前，这种模式的应用主要集中在对生物膜和生化过程的研究上，如可以用 SECM 来研究酶促反应中产生的离子以及膜的渗透性。

3. SECM 的实验装置

常规的 SECM 实验装置主要由电解池、探头、基底、各种电极、双恒电位仪、压电控制仪、压电位置仪和计算机组成[95]。扫描探头的移动可以通过相应的位置仪和控制仪来操纵，使探头在 X、Y、Z 三个方向运动，精度可以达到纳米级。一般用超微电极（SECM 的探头）作为工作电极。有关超微电极的种类及制作方法，可以参考有关文献[96]。

4. 细胞的扫描电化学显微镜研究

1990 年，Bard[97]首次用 SECM 实现了生物样品的成像。Bard 获得了草和山指甲（*Ligustrum sinensis*）叶子的图像，测量了光合作用中氧气的生成量。现在 SECM 已经是检测生命系统内现象的重要手段，被用于多种细胞表面的高分辨率成像。目前采用 SECM 研究单细胞电子转移和成像的研究小组主要有美国的 Bard 小组、Mirkin 小组以及日本的 Matsue 小组。

SECM 技术首先被用于进行各种植物细胞的光合作用和呼吸作用的研究，因为这些过程涉及氧分子的产生和消耗。SECM 可以通过非侵入测定细胞膜的电荷传递速率来研究细胞内氧化还原活性及细胞状态，实验中微电极的顶端在细胞附近扫描，获得电活性物质氧气的分布图[91]。细胞附近的氧气浓度直接反映了细胞的呼吸活性，也就反映了细胞的状态[98]。关于这方面的工作，Matsue 等已经进行了较全面的综述[99]。

2000 年以来，Mirkin 小组针对正常乳腺细胞与乳腺癌细胞系的成像、电荷转移反应和不同细胞上跨膜氧化还原动力学的差别等进行了深入的研究。Cai[100]等用扫描电化学显微镜研究了单个球形夹膜红细菌的氧化还原活性及跨膜电荷传导的路径和速率。Cai 采用了亲水、憎水两类氧化还原媒介体在电极尖端和细胞内氧化还原中心间传递电子。亲水性媒介体无法穿过细胞膜，从而获得负反馈模式[图 14.12(b)]。相反，憎水媒介体可以进入细胞，并通过细胞内氧化还原中心的反应再生[图 14.12(a)]。传递电子速率常数随施加电压和媒介体的物种、浓度而变化，给出了细胞外膜对不同离子物种的通透性信息和细胞内的氧化还原性质，绘制了细胞氧化还原活性的微米和亚微米级图像。实验中，苯醌类憎水媒介体不仅可以穿透细胞膜，还可以穿透质膜。它们先在探针上被还原为二醇，然后再进入细胞内，通过双分子反应被氧化，得到再生。

细胞内反应的异相反应速率常数与细胞内电位和媒介体的标准电位（近似为可逆反应时的半波电位 $E_{1/2}$）有关。通过作图发现速率常数的对数（$\lg k$）与媒介体的 $E_{1/2}$ 呈线性关系，即媒介体标准电位越正，速率常数越小。通过使用多种憎水媒

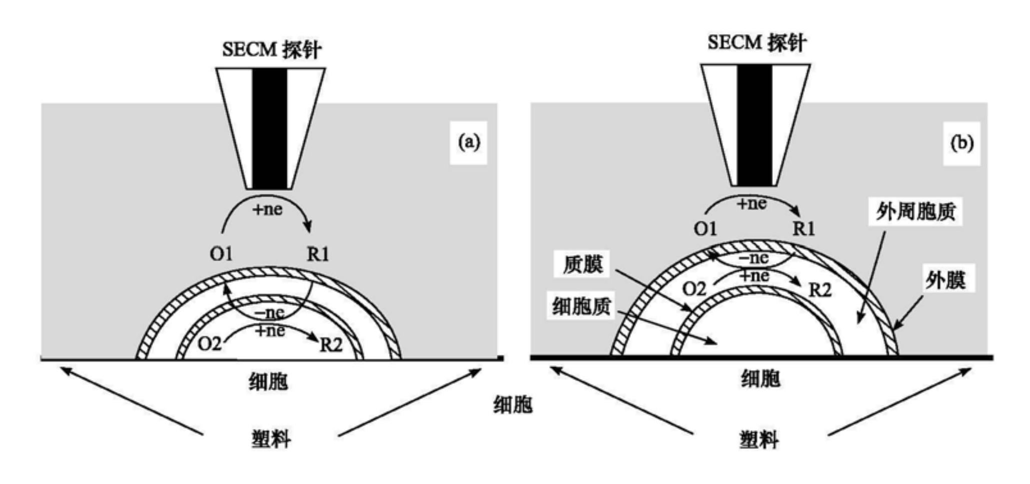


图 14.12 SECM 反馈模式示意图
(a)憎水媒介体;(b)亲水媒介体[100]

介体发现,细胞内有效氧化还原物质浓度为 50～100 μmol · L^{-1},细胞内电位为(−110±90)mV *vs*. Ag/AgCl。

$$RO_2 + 2e^- + 2H^+ = R(OH)_2 \quad \text{电极表面}$$

$$R(OH)_2 - 2e^- = RO_2 + 2H^+ \quad \text{细胞内}$$

亲水媒介体只能穿透细胞膜,不能穿透质膜,膜的渗透性成为主要的速率控制步骤,所以未发现 lg *k* 与 $E_{1/2}$ 的线性关系。用不同的亲水性媒介体得到细胞内电位为(180±70)mV *vs*. Ag/AgCl,与用憎水模式得到的值差异很大,原因可能有:①亲水媒介体只能与外周胞质中的氧化还原中心反应;②亲水、憎水媒介体与不同的氧化还原中心发生反应。

Liebetrau 等[101]采用 6 种生物相容氧化还原媒介体通过 SECM 的负反馈模式实时研究了神经元 PC12 细胞暴露于神经生长因子(nerve growth factor,NGF)前后的变化。发现细胞暴露于 NGF 后,分化为显型神经细胞,细胞主体变平,形状变得不规则,且长出狭窄而长(宽 1～2 μm,长度大于 100 μm)的并可与其他细胞相连的神经突(图 14.13)。Liebetrau 发现削尖的碳纤维电极既可对细胞本体成像,又可对神经突成像。在不与基质冲撞的情况下,探针直径越小,灵敏度越高。许多低电流的区域在光学显微镜下无法分辨,但在 SECM 图像中可清楚显现,实验发现 SECM 可以监测细胞形态上小于 1 μm 的变化。实验中采用恒高模式,电极尖端在细胞上方的一个平面内移动,此法在用于表面起伏较大的基质时,需要对高、低部分分别成像来避免尖端-基质冲撞。PC12 细胞在 SECM 标准模式下表面起伏很大,分化后的细胞主体的高度为 10～20 μm,神经突的高度仅为 1～2 μm,所以在这种情况下最好使用恒距离模式[102]。

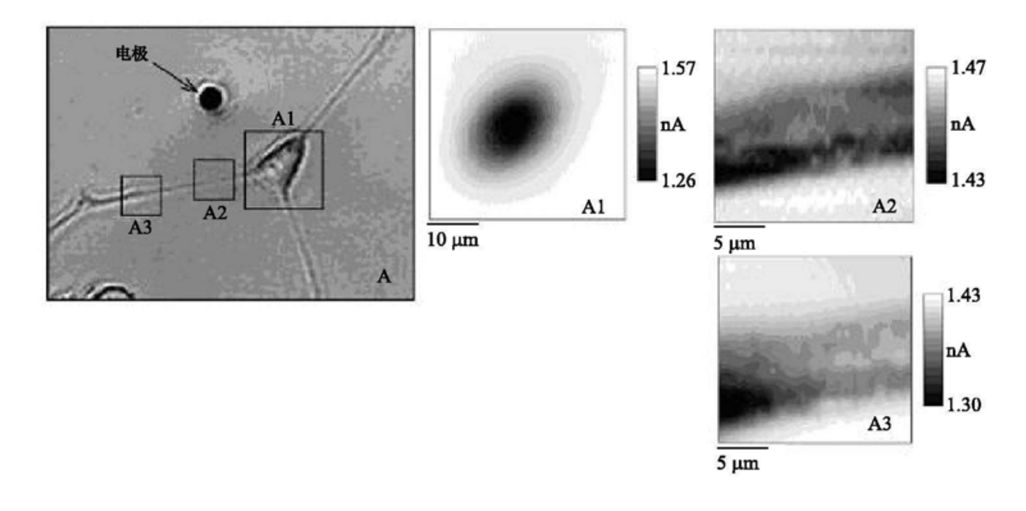


图 14.13　已分化 PC12 细胞的光学显微镜和 SECM 图像[101]

Kurulugama[102]使用碳环和碳纤维电极尖端通过 SECM 的恒距离模式研究了未分化和分化的 PC12 细胞。恒距模式需要一个依赖于距离变化的信号和反馈电路以保证探针与基质距离不变。实验中采用两种反馈信号来控制距离：媒介体的电解电流（恒电流模式）和阻抗（恒阻抗模式）。最简单的方法是恒电流模式，即通过测量媒介体的电解电流来控制电极尖端上下移动以维持恒距[103]。此法虽然简单，但是有两个缺点：①必须从外部加入一种媒介体，且需保证该媒介体是尖端能检测到的唯一电活性物种；②如果细胞分泌电活性物质，则会被探针检测到，而影响图像的准确度。Horrocks 等[104]最早采用恒阻抗模式保持恒距，此法后来得到进一步的发展。此法将阻抗信号调至高频（10～100 kHz），可以与低频的伏安信号区分开来。此法用于细胞研究有 3 个优点：①无需媒介体；②可同时测量法拉第电流和细胞形态；③仪器系统简单，无需电极修饰。Kurulugama 发现同时用碳环电极和恒电流模式可获得最好的分辨率，但是用阻抗模式可以在细胞培养液中直接测得细胞形态变化，且液泡的释放不影响阻抗信号。当把电极尖端置于恒高模式工作时，使尖端绕细胞移动，也可同时测定细胞表面形态和水泡的释放。

恒电流模式可以清楚地反映整个细胞的细节形态信息（图 14.14）。图 14.14(a)是一个拉长的 PC12 细胞；(b)显示两个临近的 PC 细胞之间生成了连接物；(c)是一个典型的分化后 PC12 细胞。

图 14.15 是恒阻抗模式下的分化 PC12 细胞图。图 14.15(a)由三张图拼接而成，图中神经突上的经索清晰可见，而最重要的是这张图是在细胞培养液中直接获得的。图 14.15(b)是一张有两个经索的神经突的近距离观察图，图中基质的最高高度只是图 14.15(a)的 1/3，表明恒阻抗模式可以对趴俯的神经元清晰成像。

图 14.15是在无需媒介体的情况下直接在培养液中获得的，为长时间监测细胞的生长和发展开辟了道路。

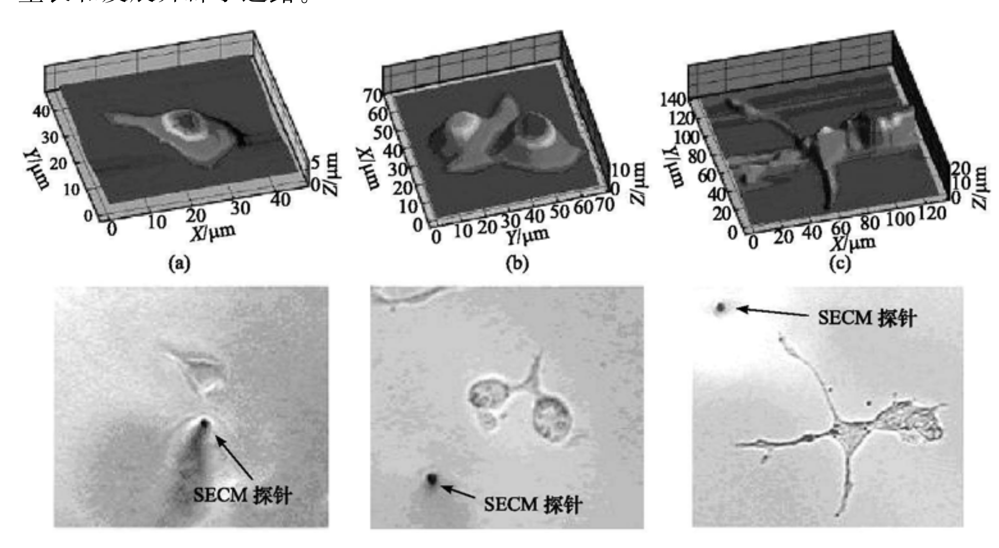


图 14.14　恒电流模式下使用直径为 1 μm 的碳环电极得到的细胞形态图

(a)未分化 PC12 细胞；(b)暴露于 NGF 后神经突初步发展的 PC12 细胞；(c)已分化 PC12 细胞[102]

图 14.15　恒阻抗模式下分化的 PC12 细胞的形态图

(a)由神经突连接的许多 PC12 细胞(RPMI 1640 培养液中)；(b)近距离观察神经突分支[102]

14.2.3　原子力显微镜

1986 年，Binnig 发明了原子力显微镜(atomic force microscopy，AFM)，又称扫描力显微镜(scanning force microscopy，SFM)，是扫描探针显微镜(scanning probe microscopy，SPM)的一种。与传统的光学显微镜不同，AFM 是以尖锐的带有传感器的扫描探针与被扫描样品间的作用力梯度信息对样品进行成像的[105](图 14.16)。由于探针的针尖尺寸只有原子大小，因而其横向分辨率为 2～3 nm，纵向分辨率为 0.5 nm，可以得到活细胞表面的三维形貌及局部电荷密度等物理特性。由于它不受样品导电性的影响，不需要固定和脱水，所以能在液体状态下对样品成像，这对于必须在生理条件下才能保持其天然状态的活细胞尤其重要。近年来 AFM 在结构生物学、分子生物学等领域的最新研究成果，特别是用 AFM 对生物分子成像、AFM 在定量研究生物分子间的相互作用力方面的研究成果前人已有较详尽的论述[106]。AFM 在细胞生物学领域的研究主要包括细胞表面特性、细胞生物过程、细胞骨架、细胞间的相互作用和细胞表面受体等。

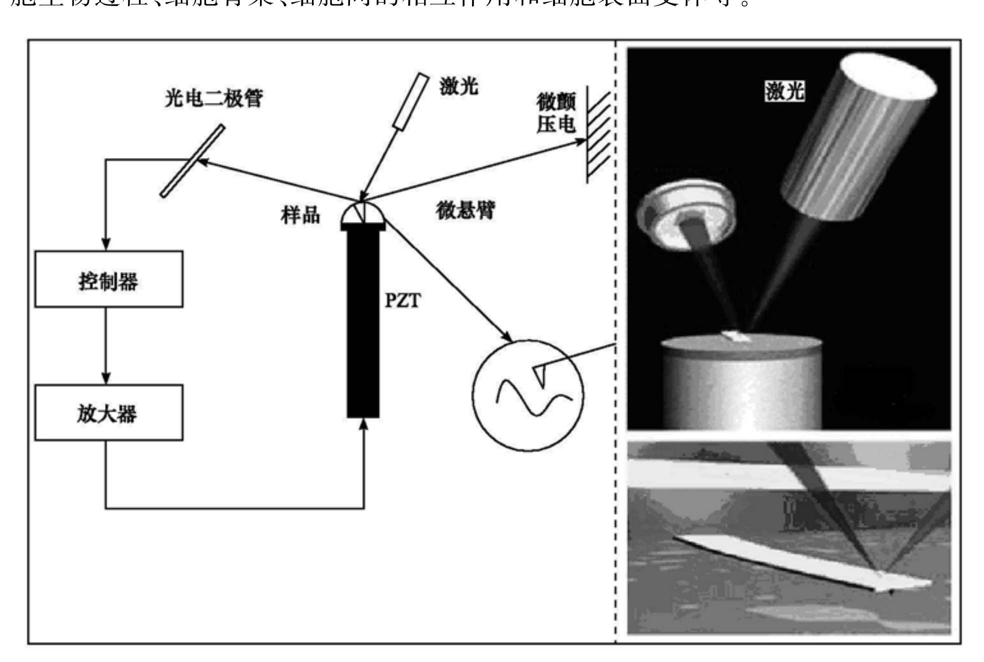


图 14.16　原子力显微镜原理图[105]

1. 细胞表面特性

最初的 AFM 由于扫描范围太小(不到 1 μm)而不能用于细胞成像，到 1989 年经改进的 AFM 的扫描范围达到几个毫米后才被广泛用于各种活细胞或固定细

胞，如白细胞、红细胞、血小板、血管内上皮细胞、巨噬细胞、肾上皮细胞、精细胞、神经母细胞、纤维母细胞、内皮细胞、单核细胞、胶质细胞、淋巴母细胞、脊椎细胞、植物细胞和细菌细胞等的成像[107]。随后人们对细胞膜的结构包括膜孔、表面抗原、膜蛋白、膜的力学特性(膜的硬度、黏弹性)和细胞的行为(相互作用、生长、伪足形成)进行了深入研究。Bemd 等[108]取了 180 个细胞并对它们成像，分别是淋巴细胞、巨噬细胞、间皮细胞、腺癌细胞和恶性间皮癌细胞，AFM 有效地展示了各种细胞的形态，显示了比光学显微镜清晰得多的图像，其中淋巴细胞仅有很少几处隆肿，巨噬细胞显示出比较模糊的吞噬细胞凹，甚至观察到了巨噬细胞正在吞噬粒细胞。最近有人在生理条件下对红细胞进行观察，能分辨出红细胞的骨架结构及其间的“裂隙”，并能确认出整个细胞的球形骨架结构和局部结构特征[109]。Girasole 等[110]观察了在药物、低离子浓度等条件下病变红细胞与正常红细胞的差别。Melling 等[111]用 AFM 首次观察到了三叉神经节的解剖结构(图 14.17)。Braet 等[112]用 AFM 观察了自然杀伤性肝细胞和结肠癌细胞共培养时的细胞毒性实验，在效应细胞和靶细胞接触后 10 min 即可检测到。Nagao[113]等首次将碳纳米管探针用于细胞的研究。以疟原虫感染红细胞，用 AFM 记录到了红细胞、红细胞外游离的疟原虫和红细胞被疟原虫感染的图像，比普通探针记录到的图像细节更丰富，分辨率更高。Tollersrud[114]观察了 4 株金黄色葡萄球菌，无荚膜的两株细菌表面

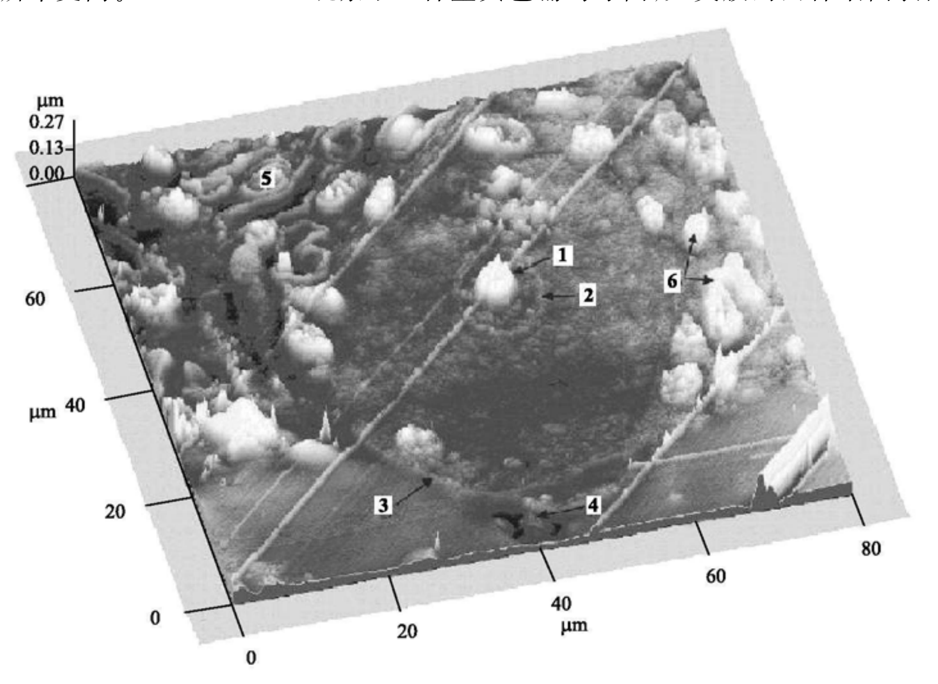


图 14.17　人三叉神经节的 AFM 图

1. 核仁；2. 核膜；3. 细胞膜；4. 套细胞；5. 三叉神经的神经纤维；6. 脂褐质颗粒[111]

光滑，有荚膜的两株表面呈黏液状，且通过对微荚膜形态的观察，可以在镜下区别这两株细菌。将 AFM 与激光共聚焦显微镜结合起来观察内皮细胞在剪切作用下的形态和力学特性，特别是观察细胞硬度的变化有较好的效果[115]。

2. 细胞骨架

在对诸如神经胶质细胞和血小板等进行研究的过程中，AFM 能分辨出肌动蛋白纤维及其他骨架纤维[116]。AFM 能够观察到细胞内的骨架结构，一种观点[116]认为可能是因为当探针扫过亚细胞结构的胞浆膜（原生质膜）时，胞浆膜本身发生变形、起皱，从而显示出亚细胞结构的轮廓，或者是探针插入胞浆膜而直接显示亚细胞骨架结构；而另一种观点[106]则认为是细胞边缘细胞质较薄，因而探针能够对亚细胞骨架直接成像，不过确切的机制仍不清楚；但免疫化学及细胞松弛素 B 实验证实用 AFM 观察到的纤维就是肌动蛋白纤维[116]。

细胞黏弹性主要依赖于细胞骨架，细胞在生理病理变化过程中会发生弹性的变化。Mathur 等[117]用 AFM 研究了内皮细胞、骨骼肌细胞和心肌细胞的黏性模量和弹性模量，可以通过测定细胞弹性的变化来推知细胞骨架的变化。利用 AFM 微悬臂的高度灵敏性，可以把细胞的病理生理反应转化成宏观上微悬臂的偏转——活细胞显微力学询问器，灵敏度极高[118]。这一成果在药品生产、环境监测甚至临床医学方面将有广泛的应用前景。

3. 细胞生物过程

AFM 也是观察细胞生物过程的一种非常有效的工具。Braet 等[119]对人的皮肤纤维瘤细胞和肝内皮细胞进行活体观察，观察到了细胞松弛素 B 作用后肌动蛋白细胞骨架的动态变化。探针在几个小时内连续在细胞表面扫描，以观察到动态过程，可以得到在固定标本上得不到的信息。Haeberle 等[120]用 AFM 记录了单个病毒颗粒从被感染细胞中释放的过程。在这个实验中，被感染的细胞是被吸附在微吸管上进行扫描的。Ohnesorge 等[121]以类似的方法研究了痘病毒和活细胞，得到了痘病毒感染活细胞全过程的 AFM 图。通过活着的细胞观察子代病毒颗粒，并用 AFM 在水溶液环境中在分子水平分辨出有规则重复的烙铁状结构（宽 7～11 nm、长 60～90 nm）和准有序的环状结构（直径 5～10 nm）。观察中发现在感染前后最初几小时，细胞并无显著变化，随后子代病毒粒子沿细胞骨架进入细胞内部，还发现了胞吐、病毒颗粒聚集等现象。此实验过程中，用微吸管吸住活细胞，先用 AFM 探针与吸管接触，得到一个微吸管的自然响应频率，然后放上细胞，探针扫描细胞表面又得到一个频率，从而就可以确定细胞在不同情况下（大小、几何形状、实验条件等）的力学响应。这也许对生物医学有重要的意义，因为它能识别不同特异性的细胞，甚至可以提供细胞内部的“光谱指纹”及反应药效，将健康细胞与

病理性细胞区别开。

4. 细胞表面受体

细胞表面受体定位一般是在黏附模式(adhesion mode)下进行的,表面受体往往定位于极富弹性的脂膜内,黏附模式比接触模式(contact mode)产生更大的高度信号反差。由于细胞在 AFM 探针的压力下因其高弹性而发生变形,导致对探针非特异性的黏附和高度信号失真,因此,细胞表面受体研究目前并非直接在其原位膜上进行,而是将其纯化后吸附到一个扁平而有刚性的表面上进行成像观察。Ludwig 等[122]采用这种方法研究了链霉亲和素-生物素之间的结合力,并将其作为黏附图像的参考。为了观察到高分辨率的 AFM 图像,他们以链霉亲和素-牛血清白蛋白模式制备样品,并在黏附模式下成像,抽取高度及黏附力信息在线分析力-距离曲线,然后建成形态及黏附图两种图像,从而揭示它们的结构模式。

经过改造的探针具有高度的生化稳定性,同时对表面的非特异性相互作用所引起的损伤极为敏感。Lehenkaria 等[123]在研究骨细胞降血钙素-降血钙素受体结合力时,配体与探针的结合采用化学吸附而不是共价结合,因为骨细胞膜表面是一层富含碳水化合物分子的网状结构,受体在这种复杂的结构中变得模糊,从而使探针尖端共价结合的数量极少的配体分子无法探测到受体分子。所以细胞表面受体的识别关键在于载体表面的建成、表面受体分子的分布以及扫描探针尖的功能化改造。

5. 细胞间的相互作用

最近,力-距离曲线(force vs. distance curve)已经被用于鉴别在特定生物反应过程中的细胞伴侣(cell partner)间的相互作用。将细胞伴侣之一连接在 AFM 扫描探针的尖端,使针尖功能化,然后沿呈单层排列的细胞伴侣的另一方进行扫描就可以进行细胞间相互作用研究。比如在胚胎移植过程中,胚囊与母体组织的最初接触是通过胚囊滋养层细胞与子宫内皮细胞的黏附作用实现的,这种黏附作用对于胚胎移植非常关键。

Thie 等[124]采用前述方法用 AFM 研究了人子宫内皮细胞系(HEC-1-A,RL 95-2)和人滋养型细胞(JAR)之间的黏附作用。他们将 JAR 功能性地结合在 AFM 扫描探针的尖端,然后与单层的子宫内皮细胞层在不同的时间段(1 min,10 min,20 min,40 min)作用。渐进力曲线(approach force curve)表明,HEC-1-A 和 RL 95-2 与 JAR 之间均存在排斥性相互作用,但是 RL 95-2 的排斥作用力比 HEC-1-A 的小,这是因为前者表面光滑、糖萼(glycocalyx)薄,而后者表面粗糙、糖萼厚。克服了排斥性相互作用后,在接触时间为 20 min 和 40 min 时,RL 95-2 表现出与 JAR 特异性结合。分离力曲线(separation force curve)显示,在 1～3 nN

范围内(间距为 7～15 μm)发生多次断裂事件(rupture event),最后一次断裂事件发生在间距将近 45 μm 处。这项研究第一次界定了滋养细胞和子宫内皮细胞间的相互作用,这对于研究多细胞生物体中细胞-细胞间的相互作用是一个非常重要的启示,比如器官移植中细胞的免疫排斥反应、癌细胞与健康细胞间的相互作用及受伤部位细胞间的相互作用等。

AFM 在生命科学研究中存在着巨大优越性,同时也存在着局限性。首先是针尖的几何形状,针尖与样品的相互作用会沾污针尖,吸附蛋白质分子或损伤样品表面。针尖的几何形状与探针压力必须综合加以考虑。第二,样品虽不必经特殊固定,但往往要加缓冲液,存在盐结晶问题。第三,针尖污染问题是影响空气中高分辨率的严重问题之一,甚至会突然失去分辨率。如果在液体中进行成像,探针被自然清洗,但又带来了新的问题,即针尖不仅与样品产生相互作用,而且与液体间也产生了相互作用。另外样品的宏观定位难度大也是不足之处。最重要的影响分辨率的原因在于针尖的曲率半径和生物样品的柔性,针尖半径决定了分辨率大小,而样品的柔性会引起测定结果的误差。

14.3　微电极实时动态检测单细胞

14.3.1　微电极

微电极,也称为超微电极,是微米以及更小尺寸的化学传感器。20 世纪 80 年代初,发明了基于氧化还原反应的伏安微电极和微装置[125]。微电极双电层电容很小,可以检测到亚微秒时间内发生的化学反应[126],其电流较小,可以进行无电解质体系、超临界流体等高电阻体系的测量[127]。当反应物种与电极之间的扩散距离远大于电极尺寸时,微电极可用于长时间测量。目前,微电极的制备已经有了很大的发展,一般是将微米金属线或碳纤维密封入一个合适的绝缘体;另外,平版印刷技术也被用来制备可同时进行电化学检测和原子力显微成像的微电极[128]。Ewing 等[129]采用火焰蚀刻法制得尖端表面粗糙、直径约 400 nm 的微电极。Wightman[130]和 Schulte[131]等采用化学蚀刻法制得了尖端达 500 nm 的电极。张学记等[132]采用离子束蚀刻法制得的电极尖端可小至几十纳米,但是成本高、耗时长,且在一般化学实验室难以制备。黄卫华等[133, 134]针对上述制作方法中用环氧树脂密封电极带来的弊端,用火焰熔融法将碳纤维密封于拉尖的玻璃毛细管内,制得低噪声的碳纤维超微电极,再经火焰蚀刻成尖端直径为 100～300 nm 的碳纤维纳米电极,该电极表面光滑,电极密封效果好,电化学性能优良。

14.3.2　细胞的超微电极电化学分析

离子和分子的运输对于维持生物系统的动态平衡非常重要。微电极由于尺寸

微小，可以检测生物系统如单个细胞或完整组织的特殊位点的分子流动。最初的测试对象就是分子氧，即将传统的 Clark 电极微型化，用微电极测量氧气流量，具有高的空间分辨率。Bard 研究组[135]用此法监测了 Ag^+ 对大肠杆菌（*Escherichia coli*）细菌呼吸作用的影响，发现由于 Ag^+ 可打断呼吸链，所以在实验开始时呼吸速度可提高。

当生物细胞处于代谢刺激时，多种分子流量将发生调整以减弱这种刺激。由于甲萘醌可扩散入肝细胞产生活性氧物种，所以对肝细胞有毒[136]。在细胞中，甲萘醌通过代谢作用转化为甲萘醌-S-谷胱甘肽配合物，被 ATP 泵移出细胞外，这个过程可用微电极通过 SECM 技术监测并定量。氧化刺激可导致细胞中产生过氧化物、NO 等物种，使用镀铂碳纤维微电极可以在单细胞水平检测这些物种[137]。

对于易发生氧化还原反应的化学物质，微电极电化学分析法具有快速、灵敏、高选择性的特点，故最适于监测单细胞的动态化学释放。近年来，超微电极电化学方法在单细胞神经递质及激素的受激释放动态监测的研究中起到了不可替代的作用，所用电极一般为碳纤维微电极和基于碳纤维的修饰微电极，测定方法以恒电位安培法和快速扫描循环伏安法为主。

Adams 等[138]最先开展这方面的工作，他们在 20 世纪 70 年代早期用 2 mm 与 50～200 μm 的碳糊电极分别对鼠大脑脊髓液中的高香草酸（HVA）、二羟基苯乙酸（DOPAC）、五羟基吲哚乙酸（5-HIAA）以及鼠大脑尾状核组织中的多巴胺、去甲肾上腺素与抗坏血酸（AA）等进行了研究。Adams 的工作可以说是活体电化学测定的开端，被公认为分析化学家探索脑化学的先驱，随后其学生 Wightman 和其他人将此领域发扬光大[139]。1990 年，Wightman 等[140]首次将碳纤维微电极应用于分析单个牛肾上腺细胞中儿茶酚胺神经递质的胞吐作用，并对牛肾上腺细胞中儿茶酚胺类神经递质释放动态监测的研究进行了评述[141]。随后，国际上几个研究组也做了出色的工作，研究的递质主要有乙酰胆碱类、儿茶酚胺类、5-羟色胺、组胺、氨基酸类、神经肽类以及特殊分子一氧化氮。现在结合快速伏安法、化学修饰电极和纳米电极，可以研究多种神经递质释放的动力学过程，进行快速检测。近几年的发展主要集中在提高检测的灵敏度和芯片应用技术方面。Gills 等[142]设计了内含多个 pl（10^{-12} L）微室的阵列芯片，并在室内喷涂金作为工作电极，将单个细胞置于室内，检测细胞的量子释放过程，简化和加速了单细胞受激释放的实时检测的过程。

14.3.3　单细胞胞吐过程中的化学传感

神经传递过程基本上控制了神经系统的所有方面，通过微电极方法，在孤立细胞中已经证实，完整大脑通过胞吐释放过程释放神经传递素。释放位点即是神经元之间的突触间隙（10～100 nm），释放的神经传递素扩散到受体，即可识别神经传递素的膜结合蛋白。神经元和其他细胞之间的信息交换通过小分子的突触分泌

实现，主要途径是胞吐释放，即囊泡附着突触前膜并使两层膜融合，形成融合小孔，将储存于囊泡内的物质，包括神经递质释放到突触间隙中，这个过程是 Ca^{2+} 依赖性的。由于胞吐释放的物质量少、持续时间短，所以需要一种高选择性、高灵敏度、快速相应和超小体积要求的分析技术来监测分泌过程，而碳纤维微电极则满足了以上要求[143]。在微操作系统的控制下，微电极距离细胞 1 μm，是一种无损技术。当将微电极与 SECM 配合使用，可以得到一张细胞的全貌图，并探测到细胞表面的释放位点[144]。微电极可以直接与细胞接触来检测分泌过程。最简单的方法是在恒电位下，用安培法检测电极附近的电活性物种的电解电流，细胞分泌的很多递质都可以用这种方法检测，包括儿茶酚胺类（多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素）、5-羟色胺、组胺、多肽（色氨酸、酪氨酸残基）以及一氧化氮。对于儿茶酚胺类和 5-HT，受体分布于整个细胞外区域，神经传递素不仅位于突触间隙[145]。神经传递素与受体的结合引发特异性细胞过程，导致神经元之间的信息传递。由于新陈代谢作用和胞吞作用，细胞外区域中神经传递素的寿命比较短暂，以维持最初的较低的浓度。为了检测神经传递素，化学传感器必须在微米大小区域及毫秒时间内检测到发生的信息传递，而且要有高度的选择性和灵敏度。碳纤维电极已被广泛用于监测麻痹的活生物的大脑中的神经传递[146]。用钌的氧化物对电极进行修饰，可以通过安培法检测胰岛素等多肽[147]。由于检测的分泌分子只位于电极和细胞之间的微小区域，所以被完全氧化，可以定量分析每个囊泡分泌的分子数。通过循环伏安法，即在一定范围内进行线性伏安扫描，可以对分泌物质定性[148]。Hafez 等[149]使用包括 4 根微电极的传感器，连续监测了牛嗜铬细胞释放位点。使用含有一根微电极的膜片钳吸液管可以进入细胞内，在细胞质水平检测递质浓度[150]。

大量实验数据表明细胞受刺激时产生的尖峰是由于囊泡的产生，而大量的非囊泡物质（如抗坏血酸盐）的流出则形成宽而连续的峰而不是尖峰，所以此法可以用于很多种细胞囊泡物质的定量分析，包括免疫系统细胞、无限生长分化的类神经元细胞、β 胰细胞，以及无脊椎动物和哺乳动物神经元。对哺乳动物神经元，每个囊泡释放的物质不超过 50 000 个分子，因此需要非常高灵敏度的检测技术（图 14.18）[151]。

使用微电极技术还发现了很多以前没有发现的胞吐释放特点。很多有较大囊泡（囊泡半径大于 100 nm）的细胞，其囊泡释放时间比释放物质扩散时间长，所以囊泡的释放受控于囊泡物质分裂所需的时间。神经元（囊泡半径约为 25 nm）以及有大囊泡的细胞，其胞吐释放不是量子化的，而是有一个较宽的分布[152]。伴随囊泡体积，可对量子大小进行药理学上的调控[153]。对有较大囊泡的细胞进行观察时，发现每一个尖峰前有一个小的基底（foot）信号出现，反映了胞吐释放前形成融合孔时囊泡物质的融合[154]。有时，基底峰出现闪烁（flickering）的情况，说明融合孔直径在变化，即单个囊泡的融合孔并不一直开启，而是出于一种快速重复的闪烁状态，重复的、部分的进行胞吐释放[155]，此时单囊泡释放呈现多重安培峰特征。

下面分类介绍微电极在单细胞胞吐释放实时动态监测中的应用。

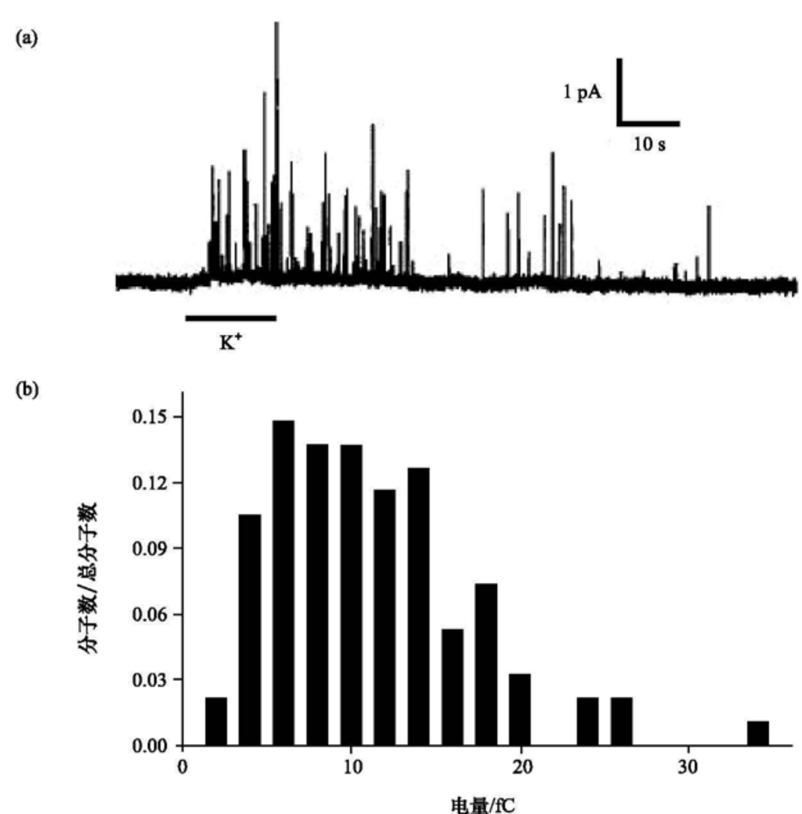


图 14.18　DA 细胞胞吐释放时的电流尖峰[151]

(a) 高浓度 K^+ 溶液作用下 DA 细胞的一系列安培尖峰；(b)（a）中尖峰的电荷分布

1. 儿茶酚胺类

儿茶酚胺类神经递质(catecholamine)包括多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)等化合物。儿茶酚胺类是一类很重要的神经递质，通常储存于神经末梢的囊泡和有膜包起来的颗粒及嗜铬颗粒中，经适当刺激，儿茶酚胺即可借助胞吐作用释放。由于它们有一个共同的化学结构，即由带有两个邻位羟基的苯环和乙酰胺侧链所组成，所以均易发生电化学氧化还原反应，适用于电化学测定。其中，多巴胺由于在脑中参与多种功能，所以是被研究的最广泛的神经传递素。

目前已有几种不同的细胞模型被用来研究儿茶酚胺类递质的释放。

1) 肾上腺细胞

研究工作大部分在牛肾上腺嗜铬细胞(bovine adrenal chromaffin cell)上进行，因

为它有和后神经节交感神经细胞(post-ganglionic sympathetic neuron)类似的特性,这使它成为研究细胞受激释放的理想模型。同时它也是研究最早的一类细胞,其胞内含有大量 300 nm 大小的囊泡,当细胞受到外界刺激时,以量子方式将其中的递质释放出来。Wightman 等[140]首次采用超微电极恒电位安培法对单个肾上腺细胞的胞吐释放进行了实时监测,将微电极置于距细胞 1 μm 处,胞吐释放出来的儿茶酚胺扩散到微电极表面被检测。他们检测到细胞在受到尼古丁或毛地黄皂苷的刺激下,释放出一个个尖峰,且每个尖峰对应于一个囊泡的释放,约相当于 1～10 amol 儿茶酚胺,为胞吐量子释放假说提供了实验依据。后来他们用高斯曲线对囊泡内的递质含量进行了模拟,得到更精确的结果,为 3.3 amol(2.0×10^6 个分子)[156]。

2) 鼠嗜铬神经细胞瘤

鼠嗜铬神经细胞瘤(rat pheochromocytoma cell,PC12)源于癌变的鼠肾上腺,可以作为神经细胞理想的模型用来研究突触的胞吐过程。

在超微电极电化学实时监测单个 PC12 细胞方面,Ewing 研究组做出了突出的工作[157]。最初的工作集中在 PC12 细胞中多巴胺量子释放的定量测定上,得到一个个的释放信号与肾上腺细胞类似(半峰宽为 9.3 ms),但 PC12 细胞内的释放囊泡的平均直径仅为 74 nm(肾上腺细胞的囊泡直径为 300 nm),所以单个囊泡释放的量非常低。他们测得单个囊泡释放量约为 190 zmol(114 300 个分子),并由此计算得到每个囊泡中递质平均含量为 0.11 $mol\cdot L^{-1}$左右。

Ewing 等[158]详细研究了单个 PC12 细胞分别受到 K^+、尼古丁以及覃毒碱刺激时多巴胺的释放情况,发现释放的量没有差别,然而三种条件下释放“潜伏期”(从开始刺激到释放的时间)的差别却很大,分别为(6±1)s(105 $mmol\cdot L^{-1}$ K^+)、(37±5)s(1 $mmol\cdot L^{-1}$尼古丁)及(103±1)s(1 $mmol\cdot L^{-1}$覃毒碱)。他们认为这种现象可能是由不同的释放机制造成的。黄卫华等[159]采用自行研制的碳纤维纳米电极,对单个鼠噬铬神经癌细胞(PC12)中神经递质多巴胺的受激释放进行了动态时空监测,首次检测到单个活细胞中单个囊泡的量子释放信号。纳米电极对单细胞释放空间分布检测结果表明,细胞不同部位多巴胺受激释放的时间和量均有显著差异,证实了多巴胺在细胞中的非均匀分布。此后,Chen 等[160]又将单壁纳米碳管修饰到这种纳米纤维电极表面,得到了一种高灵敏的纳米碳纤维电极,此电极具有良好的稳定性和重现性,有望在高时空分辨检测单细胞释放、胞内分析等方面发挥重要作用。

3) 无脊椎动物神经系统

对于无脊椎动物神经系统,蜗牛中的神经细胞研究最广泛。这种细胞很大(直径约 100 μm),在受到刺激时,释放出大量的神经递质,和通常神经细胞胞吐作用

发生的突触不同，这类巨型多巴胺细胞（giant dopamine cell，GDC）神经细胞胞吐释放发生在细胞体，经毛细管电泳以及快速扫描循环伏安方法鉴定，胞内所含的神经递质为多巴胺[58]。Ewing 研究组[161, 162]最早开展这种细胞受激释放的实时电化学监测，细胞受到 1mol · L^{-1} KCl 刺激后，一次刺激可以引起多达 89 000 个囊泡的释放，单个囊泡内多巴胺平均含量为 1.36 amol（818 000 个分子）。

4）哺乳动物神经系统

哺乳动物神经细胞一旦成熟就不再增殖，而且哺乳动物神经细胞的释放囊泡比其他细胞小（一般小于 100 nm），每个囊泡所含的神经递质量也很少，造成胞吐作用时间非常短，且电流很小，要求监测系统必须具有很高灵敏度及快速响应速度。Zhou 等[163]最早采用碳纤维微电极实时检测了上颈交感神经细胞中多巴胺的释放。Wightman 研究组[151]将膜片钳电流放大技术与超微电极相结合（实验装置如图 14.19 所示），成功进行了低于 1 pA 电流的测定，并对鼠视网膜神经细胞多巴胺的释放进行了实时测定，得到囊泡内多巴胺的含量在 8～170 zmol 之间，平均含量为 52 zmol。

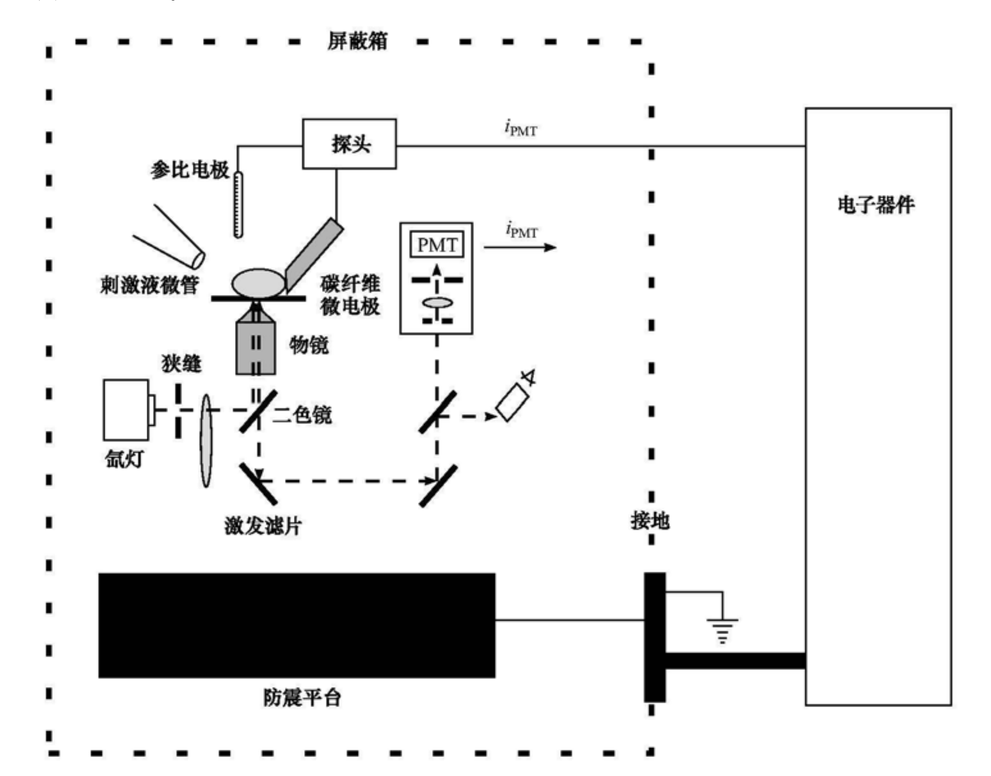


图 14.19　测量神经元 zmol 分子释放实验装置图[151]

2. 5-羟色胺和组胺

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)是一种分布广泛的生物内源性吲哚胺,作为神经递质存在于哺乳动物大脑内。组胺作为神经递质,强烈地强化多种兴奋信号,与维持觉醒状态、情感的控制、记忆功能及偏头痛等有关。因 5-HT 与组胺均能发生电化学氧化还原反应,故能用电化学方法监测其释放的胞吐作用。

最早开展 5-HT 与组胺释放的工作主要是针对肥大细胞,Wightman 研究组做了较出色的工作。由于 5-HT 的氧化产物容易在电极上吸附毒化电极,影响进一步测定,Wightman 等[164,165]将快速扫描循环伏安法用于对 5-HT 与组胺的检测。首先毛细管色谱测定单个鼠腹腔肥大细胞 5-HT 与组胺总量分别为(3.8±1.3)fmol及(150±18)fmol,进一步采用碳纤维微电极及 Nafion 修饰电极检测细胞内 5-HT 释放,结果表明单个囊泡所含 5-HT 平均量为 7.3 amol (4 400 000个分子)。另外他们同时测到了鼠肥大细胞中 5-HT 与组胺共同释放,首次在单个细胞水平上证实了生物细胞的共释放理论。

3. 胰岛素

在胰岛素释放的超微电极电化学实时监测以及释放机制研究方面,Kennedy 研究组的工作比较突出。他们制备了一种钌化合物(Ru-O/CN-Ru)修饰碳纤维微电极,这种化合物对胰岛素具有良好的催化氧化能力,制备的修饰电极对胰岛素有较高的灵敏度及优良的选择性。单个 β 胰细胞胞吐释放实时监测结果,得到单个囊泡内胰岛素平均含量为 600 zmol,且胰岛素的释放也是 Ca^{2+} 依赖性的[166]。另外他们进一步对胰岛素释放机制及动力学过程进行了更详细的研究,研究结果认为,β 胰细胞内的胰岛素以 Zn-胰岛素配合物的形式储存,胰岛素的释放需要囊泡的溶解及配合物的解离,因此 pH 与 Zn^{2+} 浓度对胰岛素释放有很大的影响[167, 168]。

4. 一氧化氮

NO 是一种重要的生物调节因子,在生物体内起着多种重要的作用。NO 的释放并没有一般神经细胞释放所需的囊泡,而是弥散于胞浆中起生理作用。Malinski 等[169]利用卟啉对 NO 氧化的催化作用,用火焰灼烧的方法将碳纤维微电极尖端削尖至 0.5 μm,然后电化学沉积上镍卟啉,并用 Nafion 膜修饰,消除了 NO_2^- 对测定的干扰,用血管舒缓激肽分别刺激内皮细胞及平滑肌细胞,电化学监测了单个细胞中 NO 的释放。他们发现 NO 的释放并无一个个的尖峰,而是上升至一个平台,平台延续时间长达十几分钟,这一现象也间接证实了 NO 的非胞吐作用释放。

14.4 细胞电化学与细胞传感

细胞作为电化学活体在电极上能给出明显的电化学伏安响应。细胞不同于电化学质点的显著特点是细胞本身是一个电化学体，细胞内所发生的一系列生化反应及生理过程所涉及的电子产生与传递都会影响并改变其表面的静电分布。近年来，细胞的固定和定位研究已有比较成熟的方法，发展新型的细胞固定和操纵方法对细胞的增殖和分化研究具有明显的意义。在单个细胞水平上进行研究，可以获得反映细胞生理状态和过程的更准确、全面的信息，还可以使人们能更好地了解细胞群体中某些特殊的细胞功能，更深入认识细胞个体差异、细胞间相互作用和信息传递以及神经递质、药物或毒物刺激的生理影响。

14.4.1 细胞电化学研究意义

细胞是由生物大分子和其他必要的分子和元素构成的、有严整结构的生命单位和基本结构单位，它是一个具有结构特征的生化反应体系。无论是多么复杂的生物，生命的各种活动都是在细胞代谢基础上实现的，因此细胞生物学的研究受到越来越广泛的重视，并且进展迅速。早在 30 年前由电化学和生物学交叉形成的学科——生物电化学就诞生了，并得到迅速发展，相继出现了蛋白质电化学、核酸电化学、多聚糖电化学、酶电化学、细胞色素电化学等生物大分子电化学。大量的形态学实验表明，细胞内部充满着相互间有结构特征关联的细胞骨架[170, 171]。细胞这种结构上的物理化学特征为细胞水平上的电化学行为提供了理论基础，细胞的新陈代谢、呼吸作用、光合作用、信息传递、物质的跨膜传输等都涉及这些电活性粒子的定向有序的传递、传导或转移；涉及细胞物质有序、专一、特异的氧化和还原。细胞的这些生化反应与电极上发生的电化学反应极其相似，可以认为细胞的基本活动是以电化学反应为基础的，因此，电化学是研究和探讨生命现象和本质最合适、最有力的手段。

细胞电化学是基于电化学原理、实验方法与细胞、分子生物学技术的相互结合，对细胞进行分析和表征，研究或模拟研究细胞荷电粒子或电活性粒子能量传递的运动规律，揭示细胞结构-功能关系和外源分子对细胞功能影响的一个新研究领域[172]。细胞电化学研究将在细胞水平上深入认识生命体系的运动规律，并为揭示生命过程提供科学依据和研究方法。细胞作为电化学活性体在电极上给出明显的电化学伏安响应，可用于肿瘤及癌症活体组织离体、在体的临床诊断。研究表明所有活细胞的表面都存在电化学信号，这是因为在各种细胞生命活动中往往伴随着氧化还原反应以及离子成分和浓度的改变。活细胞的氧化还原中心可在电位扫描中产生响应，贯穿细胞膜的蛋白质与活细胞构成了一个氧化还原体系。将一个

活细胞比作一个电化学动力学体系，在活细胞的各种界面上都存在电子的能级跃迁和电子传递。细胞电化学行为的研究为揭示生命及其活动的奥妙提供了一条很有意义的途径，为疾病的诊治，抗癌、抗衰老药物的设计，药物副作用的控制，食品、医疗、发酵、环保等微生物检测或监控，农作物的生长，动物的快速养殖提供了科学理论和实验依据。

近年来，随着生命科学与材料、信息、化学、物理等学科间的交叉渗透，生物传感和分子信标等生物分析方法的研究得到飞速发展，新的光化学、电化学传感器不断问世。其中，电化学生物传感器的发展尤为迅速。由于电化学方法简单、快速、灵敏，而电极的微型化及其表面修饰技术也日益成熟，电极通过巧妙的修饰和分子自组装，不仅极大地提高了灵敏度，而且还具有很高的识别专一性。因此，采用电化学微型传感器将使细胞内信号分子的实时检测和监控的梦想成为现实。利用电化学探针进行间接的测定和检测细胞中特定物质的变化也是非常重要的。一定的电化学探针可以充当生物反应的起始物，通过生成物的变化监测催化反应的生物物质的浓度。已经知道一些电化学活性的染料分子可以自由进出细胞，从中筛选出符合要求的电化学探针将是可行的。随着新方法的不断问世，酶联免疫以及 PCR 扩增技术已日渐成熟，这些方法可以进行生物放大，提高检测的准确性和灵敏度，特别是可用于研究细胞在分化和增殖过程中涉及的酶和其他催化反应的能量转移过程。

14.4.2　细胞内电子传递的统一性

同质子、离子相比，电子具有很高的荷质比，这意味着电子具有更快的传递性能。关于细胞内电场的建立，很可能存在以下的模型：在电子受体（例如 O_2）的作用下，电子脱离氢核的束缚，在代谢系统中，电子与质子分别按各自专有的途径传输。由于电子传输比质子快得多，使体系得到极化，导致细胞内局部电场的建立。细胞内部无数局部电场的建立有机地影响细胞的电化学行为。我们知道，电荷的传输是有条件的，其中一个重要的条件就是电荷载体。电子电荷在细胞膜上镶嵌的电子载体之间的传递是被公认的普遍现象。很多研究工作表明，电子在蛋白质中的传递具有半导体性质[173]，细胞在电化学电极上的反应阻抗随温度的变化符合阿仑尼乌斯（Arrehnius）半导体方程[174]。生命体系内电子传导的重要性在于深刻地认识生命活动的原动力。著名的化学渗透理论阐明了质子梯度是三磷酸腺苷（ATP）合成的动力。然而，在施加电场的情况下发生了叶绿体与亚线粒体中 ATP 的合成，并且发生在质子梯度建立前[175]。人们已经认识到，不仅在线粒体膜体系，在细胞质膜体系、细胞核膜及细胞表面膜等非线粒体膜体系中也存在电子传递。细胞作为一个电化学活体，其电化学行为及光电化学行为说明细胞体系中电子传递体的存在。

14.4.3　细胞的电化学伏安响应

细胞的生化反应与电极上发生的电化学反应极其相似，可以认为细胞的基本活动是以电化学反应为基础的。研究表明生物活细胞的电化学伏安行为(即被动电子伏安行为)是不可逆的电极过程，根据其不可逆程度和响应强度的测定可以研究细胞数及细胞状态，分析和评价细胞的生长、细胞活性、聚集状态、药物的作用、细胞凋亡以及细胞生长因子的作用。细胞伏安传感器是基于细胞伏安行为研制开发的，不仅可用于微生物的分析检测，还可用于细胞状态分析、聚集态的分析、细胞免疫分析、肿瘤及癌症活体组织离体和在体的临床诊断。

1. 细胞电化学

细胞内部的电子传递与外电路连起来，可以通过伏安法或其他稳态电流测量方法研究细胞直接电化学，并确定细胞数量和活性[176, 177]。Hobson 等[178]报道了使用不同电位技术及电极材料的用于检测细胞数量的安培法。Matsunaga 等[179]和 Ci 等[180]用裸玻碳电极对细胞进行直接氧化。Matsunaga 等[181]和 Han 等[182]用修饰电极研究了细胞的直接电化学。通过浓缩细胞悬浮液[9]或测定前先将细胞吸附于电极表面[182]，可观察到通过物理作用吸附于电极表面的细胞与电极之间的电子传递。大多数情况下，细菌细胞不分泌氧化还原活性媒介体或电子传递蛋白，只有当细菌细胞与电极直接接触时才能促进电子传递，由此产生了电极电荷和电位的变化，并产生电流。生物膜吸附在电极表面并达到稳态需要较长的一段时间，一般为20～30 min[183, 184]。为加快电子传递，需要加入电子传递媒介体[185, 186]。

慈云祥研究组[185]将酵母(*Saccharomyce scerevisiae*)细胞固定在石墨电极上，研究了活细胞的伏安行为，处于同一生长期的细胞的峰电流与细胞浓度成线性关系。用伏安法检测细胞浓度还可通过利用活细胞对电活性中间体的酶催化循环效率与细胞浓度的关系进行。

电化学方法可用于检测存活和存活但非生长状态的细胞。Kuznetsov[187]用电化学方法研究了耻垢(*Smegmatis*)分枝杆菌细胞转化为睡眠非生长状态的动态过程。耻垢分枝杆菌细胞在非优化状态下(比如半饥饿状态)可以转化为睡眠非生长状态。由于电活性的变化与生物数量的变化成平行关系，所以笔者在电子传递媒介体 DCIP 存在的情况下施加一个＋350mV 的电压，发现睡眠非生长状态的细胞的响应电流减少了 80％，表明处于睡眠状态的细胞新陈代谢速度减慢。

利用金胶纳米粒子与细胞的相互作用可将 AsPC-1 胰腺癌细胞固定于金胶修饰碳糊电极表面，从而开展 AsPC-1 胰腺癌细胞的电化学行为研究[188]。它在 pH7.4 的磷酸缓冲溶液中的循环伏安响应表现为一个明显的氧化峰，峰电位为＋0.813V，如图 14.20 中曲线(d)所示。连续扫描时，细胞的电化学信号急剧下降

乃至消失(图 14.20 插图),AsPC-1 胰腺癌细胞的伏安响应表现为一不可逆电子传递过程。金胶作为仿生界面不仅保持了癌细胞的生物活性,而且改善了电子的传输通道,使细胞的氧化峰电流明显增高[图 14.20 曲线(c)和(d)]。AsPC-1 胰腺癌细胞的氧化峰电位与鸟嘌呤的氧化峰电位接近[图 14.20 曲线(e)和(d)]。高效液相色谱和质谱分析证明,细胞的伏安响应与细胞膜表面鸟嘌呤的氧化有关,因此在 AsPC-1胰腺癌细胞的培养液中含鸟嘌呤时,癌细胞的生长代谢以及合成嘌呤核苷酸的能力增强,导致电化学响应增大[图 14.20 曲线(f)]。

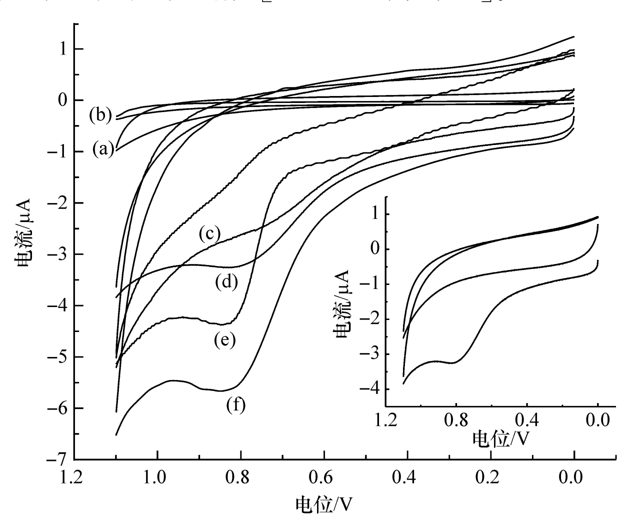


图 14.20　固定化 AsPC-1 胰腺癌细胞的循环伏安曲线(v=50 mV · s^{-1})[188]

CPE (a), Au-CPE (b), AsPC-1 cell-CPE (c)与 AsPC-1 cell-Au-CPE (d) 在 pH 7.4 PBS 中; Au-CPE 在含 5.0 mg · ml^{-1}鸟嘌呤的 pH 7.4 PBS 中(e); 培养液中加 5.0 mg · ml^{-1}鸟嘌呤的 AsPC-1 cell-Au-CPE 在 pH 7.4 PBS 中 (f)。AsPC-1 cell-Au-CPE 在 pH 7.4 PBS 中连续扫描

2. 生物分子吸附层的电化学研究

细胞产生多种细胞外矩阵(extracellular matrix),包括蛋白质和黏多糖,此外,细胞还产生细胞附着蛋白质,并使之附着于细胞外矩阵和材料上。生物分子的吸附层包括了多种氨基酸、蛋白质和在界面形成的细胞外矩阵,其中吸附的蛋白质位于双电层中,即生物分子的吸附层部分地位于双电层中,所以细胞可以改变生物分子吸附层的电性质[189]。

Hiromoto[189]等采用不同的电化学方法研究了鼠纤维原细胞 L929 对细胞和钛界面电化学性质的影响。当细胞附着于钛表面时,阴极电流密度降低,导致阴极和阳极间平衡电位移动,使钛的开路电位降低。在阴极电位阶跃实验中,L929 细胞使电流密度降低,峰电流密度延时,表明细胞减弱了分子、离子的扩散。阻抗实

验表明生物分子吸附层扩散电阻变大。结论是，界面上的细胞产生包括蛋白质和黏多糖的细胞外矩阵，增加了生物分子的密度，阻碍了生物分子吸附层中的扩散。

14.4.4　细胞的电化学阻抗行为

1. 交流阻抗方法

交流阻抗方法是一种暂态电化学技术，用小幅度交流信号扰动电解池，并观察体系在稳态时对扰动跟随的情况，测量电极的交流阻抗，进而计算电极的电化学参数。这种方法对电极表面干扰小、测量速度快，因此是研究电极表面变化的有效工具。采用阻抗技术检测细胞一般分为两类：法拉第阻抗法和非法拉第阻抗法。两者的区别在于是否使用氧化还原探针，电化学阻抗法属于法拉第阻抗法。

自然界中细胞的细胞膜厚度一般在 5～10 nm[190]。细胞类型不同，膜位置不同，细胞的膜电阻在 1 MΩ · μm^2 ～100 GΩ · μm^2 变化。考虑到大多数生物细胞膜的厚度为 8 nm，细胞膜阻抗一般为 0.01 pF · μm^{-2}[191]。Ehret 等[192, 193]研究表明，在电极表面固定细胞后进行电化学阻抗测定，电子传递电阻 R_{et} 显著增加，即细胞阻碍了电极与氧化还原物种间的电子传递。所以通过检测电子传递阻抗可对电极表面分析物进行定量[194, 195]，及研究细胞在电极表面的附着、增殖和死亡。由于细胞膜的绝缘性质，使细胞膜阻抗还对电极界面电阻 R_s 有影响，在等效电路图中附着的细胞作为电阻与溶液电阻串联，即固定细胞后的溶液电阻包括原溶液电阻和附着细胞的电阻。此外，固定细胞后，Warburg 阻抗也变大，这种变化反映了固定的细胞对氧化还原探针在电极表面与溶液之间扩散路径的影响，即由于细胞的固定使氧化还原探针更难接近电极表面，从而使 Warburg 阻抗增加。但是，固定的细胞不影响电极的双电层电容[196]，其原因可能是因为细菌细胞固定在电极表面时通常和电极之间有一个 10～20 nm 的空隙(最大可以到几百纳米)[197]，这个细胞膜与电极表面的溶液空隙阻挡了细胞膜电容对电极的影响。另外，细菌细胞一般长 1～2 μm，直径为 0.5 μm，而双电层的厚度为几百埃，所以细菌细胞并不在电极理论双电层的范围内，细胞的固定不影响电极的双电层电容。

Li 等[194]通过抗-*E. coli* 抗体将大肠杆菌 O157∶H7 细胞固定在环氧硅烷单层修饰的铟锡氧化物电极表面，再滴涂碱性磷酸酶标记的二抗，用电化学阻抗法研究了夹心复合物发生免疫反应 5 min 后的电极阻抗行为，发现环氧硅烷单层和抗体层使电子传递电阻显著增加，固定细胞后，电子传递电阻和 Warburg 阻抗增加。

电子传递阻抗(R_{et})与细胞浓度(N)呈式(14.1)的半对数关系。检测限是6×10^3细胞 · ml^{-1}，半对数线性范围为 6×10^4～6×10^7 细胞 · ml^{-1}，相关系数是 0.957。

$$R_{et} = 155.5\lg N - 660.9 \tag{14.1}$$

Li 等[198]进一步将大肠杆菌 O157∶H7 细胞通过抗-*E. coli* 抗体固定在涂覆

了铟锡氧化物(ITO)的交叉阵列微电极上,用电化学阻抗技术研究了细胞固定过程中电极表面电子传递阻抗的变化(图 14.21)[198],电子传递阻抗(R_{et})与细胞浓度(N)的关系为

$$R_{et} = 429 \lg N - 1760.7 \quad (14.2)$$

线性范围是 $4.36\times10^5 \sim 4.36\times10^8$ cfu · ml^{-1},相关系数为 0.98。

Huang 等[199]用电化学阻抗法研究了 U-2 OS 类造骨细胞在光洁钛、Ti-6Al-4V 合金表面 72 h 内的增殖行为。此研究的原理基于电子传递阻抗随细胞生长(包括细胞的附着、铺展、增殖)而变大。

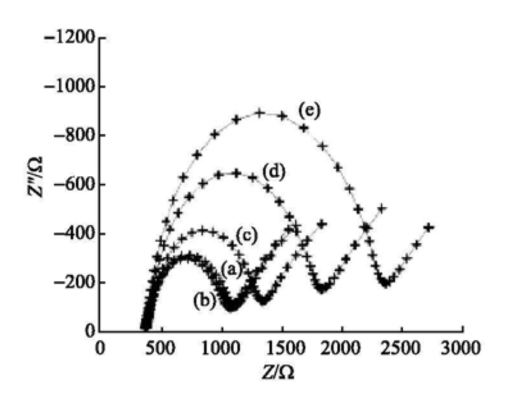


图 14.21　交流阻抗图谱

(a) 抗体;(b)4.36×10^5;(c) 4.36×10^6;(d)4.36×10^7;(e) 4.36×10^8 cfu · ml^{-1} *E. coli* 细胞[198]

2. 电细胞-基质阻抗传感技术

电细胞-基质阻抗传感技术(electric cell-substrate impedance sensing,ECIS)是一种实验过程中实时无损伤测定覆盖有细胞的金电极依赖于交流信号频率的电阻抗行为的方法,通过数据建模分析记录的阻抗数据可以获得电极表面细胞的形态信息[200]。

ECIS 方法的基本原理如图 14.22 所示[201]。当哺乳动物细胞在平面金薄膜电极附着并铺展开时,它们作为绝缘粒子阻碍了电极和本体溶液之间的电流,增加了总电极阻抗。当施加的交流信号的频率足够高时,一部分电流可以以电容的模式

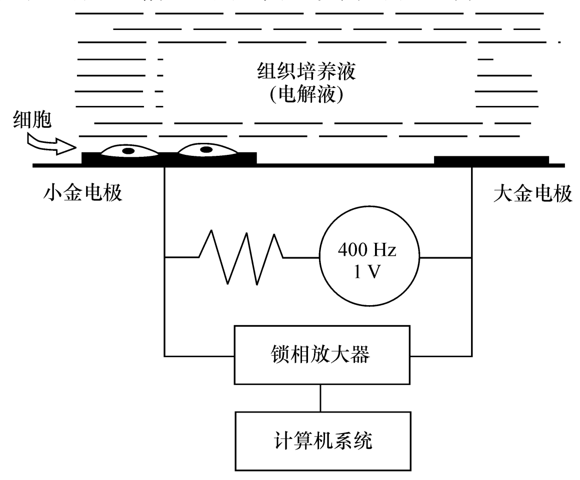


图 14.22　细胞贴壁界面阻抗测量原理图

穿过质膜到达细胞层,此为穿透细胞途径;而在大多数频率下,电流需要绕过细胞,在细胞与电极之间的狭窄的通道通过。两种电流经历了不同的阻抗模式,穿透式电流与产生于细胞质膜的阻抗有关,而绕过式电流依赖于细胞附着区域和细胞间裂缝的阻抗。两种阻抗各自对总阻抗的贡献由施加的交流信号的频率决定,所以在一个较宽的频率范围内测量阻抗可以将两种阻抗分开并定量。ECIS 技术的优点在于:①无损伤;②记录数据可定量;③可测细胞不同状态间的功能变化而不是结构变化;④实验由电脑控制,可实现自动化。

ECIS 被成功用于检测不同实验条件下、不同细胞种类的细胞形态变化。Arndt 研究组[202]采用电细胞-基质传感技术,实现了实时无损伤监测细胞凋亡。该方法是在不同的时间无损伤检测固定有细胞的金薄膜电极随频率变化的电阻抗行为,由记录的阻抗数据获得细胞的形态信息。Tiruppathi[203]用 ECIS 研究了在牛上皮细胞中加 α-凝血酶后的形态变化。Lo[204]用 ECIS 研究了在细胞培养箱中周期性加入 CO_2 后细胞的形态变化。当把人眼窝纤维原细胞暴露于前列腺素 E 时,用 ECIS 技术可检测到细胞形态的巨大变化[205]。

14.4.5　肿瘤细胞的电化学疗法

肿瘤的电化学治疗已经有 100 多年的历史,关于肿瘤破坏的文献涉及各种肿瘤模型,如皮下恶性毒瘤[206]、恶性黑素瘤[207]、肌肉灌输肝细胞瘤[208]、皮下 Lewis 肺癌[209],最近集中于肝癌[210, 211]的研究。

电解过程可导致 pH 变化,阳极相对于阴极变为酸性,导致定位软组织坏疽[212]。由于水分子可作为偶极子,所以在电场作用下水从阳极到阴极电渗透,使阳极周围的组织脱水,而阴极周围的组织水肿[213, 214]。使用强或弱的高压交变电场或电脉冲方法作用于生物活细胞[215, 216],将影响细胞内的自由基反应[217]和 DNA 等生物高分子的合成[218],并伴随着一切后续现象。据此,可用来改变和控制细胞生长[219]。Wong[220]实现了将主动脉内皮细胞培养在电极上,通过控制电极电位来控制细胞的生长速度。

在强的单脉冲电场作用下,细胞壁发生电损伤,细胞膜电穿孔,甚至细胞组织坏死,从而可建立肿瘤组织的电化学疗法。将电通透性与化疗联用增强肿瘤细胞对药物的摄入而减少化疗药物的剂量是间接电化学疗法。Heller[221]对长有黑色素瘤 C_{57}BL/6 的小鼠给予化疗药物争光霉素 0.25 u 和电脉冲(1.5 $kV \cdot cm^{-1}$, 99 μs),肿瘤明显减小,57%的小鼠的肿瘤消失。研究化疗与电脉冲联用的规律(如最适电场强度和最小有效剂量)和机制,为临床应用提供依据是很有意义的研究。Euler[222]将 R3230AC 鼠乳腺瘤细胞株克隆 D 皮下注射到雌性费希尔 344 鼠上诱导肿瘤产生,然后将铂电极插到肿瘤上,进行电化学治疗。分别对治疗后 0、7、14 天的鼠实行安乐死,取出肿瘤组织用组织病理学方法和免疫组织化学方法检

测。发现细胞的增殖行为在阳极、阴极附近明显减弱，细胞凋亡发生在阳极附近最初坏疽部分的外面。

14.4.6　细胞在新型仿生界面的增殖与固定技术

1. 细胞固定技术

生物传感器是一种能够连续和可逆地感受化学量和生物量的一种装置，它既可以进行分子识别，也可以被视为信息采集和处理链中的一个逻辑元件。生物传感器的传感原理以图 14.23 表示[223]。待测物质经扩散作用进入固定化生物敏感膜层，经分子识别，发生生物学反应，产生的信号继而被相应的化学或物理换能器转变成可定量和可处理的电信号，再经过二次仪表放大并输出，便可知道待测物浓度。生物化学传感器的性能好坏主要取决于接收器的选择性、换能器的灵敏度以及它们的响应时间、可逆性、寿命和电子系统的可靠性。



图 14.23　生物传感器传感原理[223]

酶、抗原、抗体、激素或生物体本身(细胞、细胞器、组织)通常被视为敏感元件，固定在载体膜上，构成传感器的敏感膜，即接受器。生物敏感膜依所选材料不同，可以是酶膜、全细胞膜、组织膜、免疫膜、细胞器膜、杂合膜等。

为了研制廉价、灵敏度高、选择性好和寿命长的生物传感器，固定化技术是细胞生物传感器的研究和开发中最为重要的工作。在选择细胞作为固定化材料和方法时，应考虑到固定化过程的反应条件和所用的化学试剂的无害性，固定化过程宜于在无菌条件下操作，并且细胞的稳定性要好，有一定的机械强度。经过近年来的不断发展，细胞固定所用的基体电极包括玻碳电极、铂电极、金电极、pH 玻璃电极和氧电极等。固定细胞常用的方法有以下几种(图 14.24)：夹心膜法、吸附法、包埋法和共价交联法等。

2. 细胞在新型仿生界面的增殖与细胞传感器

细胞在分裂与增殖之前必须进行各种必要的物质准备，细胞生存的外部环境如温度、湿度、pH 条件以及细胞贴壁生长的载体性质对细胞增殖起着至关重要的作用[224, 225]。为满足医学、细胞生物学、材料科学等领域的研究，常常需要在体外进行细胞培养，生物相容性的载体通常可以作为细胞依附生长的材料[226]。载体

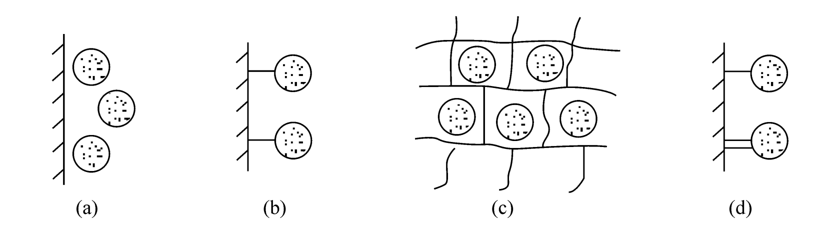


图 14.24　细胞固定方法

(a) 夹心膜法;(b) 吸附法;(c) 包埋法;(d) 共价交联法

的表面性质如粗糙度[227]、亲水性[228]、荷电状态[229]、表面活性[230]、表面形貌[231]以及特殊的细胞作用因子[232]等都会影响细胞的活性和吸附能力[233]。因此,设计合成新型的生物材料并作为细胞依附生长的载体越来越引起研究者的广泛关注,构造生物仿生界面用于研究细胞增殖、凋亡及细胞因子表达等对指导临床诊断与治疗有重要的价值和广泛的应用前景。

肿瘤细胞寿命长、增殖性强,将其固定于生物仿生界面进行培养和贴壁生长,可使肿瘤细胞表面自身抗原充分裸露,改善抗原与细胞因子的检测灵敏度,提高阳性率,同时为深入研究细胞因子与生物材料之间的相互作用提供了新的方法。

近年来,在寻找新型仿生材料作为生物分子的固定化载体的过程中,溶胶-凝胶材料引起了人们的极大兴趣。溶胶-凝胶材料具有一些十分诱人的特性:①制备方法简单;②具有孔径可调的多孔结构[234];③能使生物分子在较低的温度下被包埋而使其保持生物活性且不易泄漏,并保持自身结构、活性和功能。溶胶-凝胶本身具有化学惰性和透光性、低的溶胀性和良好的机械稳定性,已成功地用于酶、蛋白质、抗原和抗体的固定。

金胶作为细胞化学和组织化学中的常用标记物,能为生物分子提供一个特殊的、具有生物兼容性的微环境。利用金胶纳米粒子来构筑生物分子的直接电子传递界面并保持其生物活性的研究已被广泛报道[235~239],具有广阔的应用前景。陈洪渊等[240, 241]在深入研究了纳米金胶的生物活性和导电性后,实现了肝细胞在纳米金胶电极上的固定与增殖,该细胞传感器可用于乳酸的测定。鞠熀先等[188]构建了纳米金胶修饰碳糊电极的仿生界面用于活细胞的固定,如图 14.25 所示,研究了固定于纳米金胶修饰碳糊电极表面的 AsPC-1 胰腺癌细胞的伏安行为,提出了细胞毒效应的电化学研究新方法。

该研究组进一步在电化学预处理的玻碳电极表面形成纳米金胶修饰的甲氧基硅烷-丁酰壳聚糖(Au-CS)膜,构造了具有良好的生物兼容性的仿生界面,实现了 K562/ADM 白血细胞的固定,并建立了一种肿瘤细胞表面分化抗原的原位电化学免疫检测新方法[242]。原子力显微镜观察到 Au-CS 膜形态均一而且分布均匀,固定在膜上的 K562/ADM 白血细胞能有效地保持其生物活性和完整性(图 14.26)。

该材料价廉易得，且具有低毒性、亲水性、化学稳定性和生物兼容性，用于细胞的固定应具有很好的应用前景。

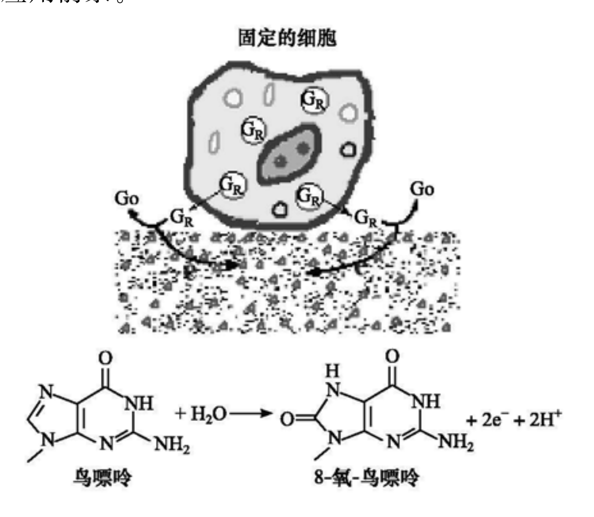


图 14.25　细胞固定及电子传递示意图[188]

○金胶纳米粒子；碳糊电极

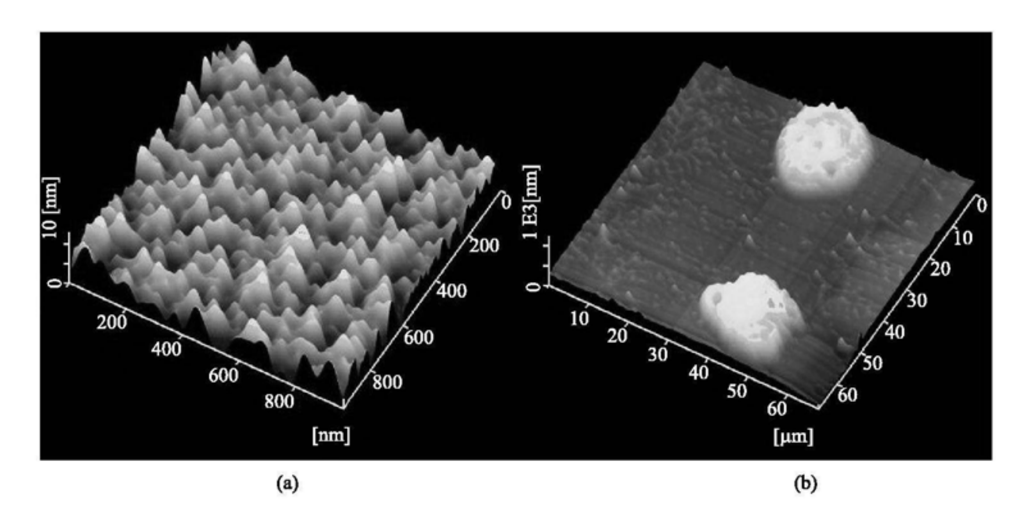


图 14.26　原子力显微镜图像

(a) Au-CS 膜；(b) 固定于 Au-CS 膜表面的 K562/ADM 白血细胞

Grainger 等[243]研究了在纤维黏接蛋白预吸附的材料表面，亲水性的羧基功能表面可引起高含量的纤维黏接蛋白黏附，并由此导致成纤维细胞良好的黏附和铺展。最近利用图案化表面可以精确控制表面的化学性质，以蛋白质纳米离子修饰的表面可进一步诱导细胞吸附，并有效地保持了细胞的活性[244]。

鞠熀先研究组在羟基化玻璃表面构建了 *N*,*N*-二甲基-β-羟乙氧乙基丙磺酸铵[*N*,*N*-dimethyl (β-hydroxyethyloxyethyl) ammonium propanesulfonate,DHAPS]两性离子膜的仿生界面[245]。该界面具有高度的亲水性、良好的生物相容性和稳定性,为蛋白质分子保持其天然构象提供了生物兼容的微环境,实现了 K562 白血细胞在带有磺胺两性离子仿生膜界面的吸附与增殖,并且细胞生长旺盛。

用台盼蓝染色可判断细胞凋亡情况。当细胞凋亡后,细胞膜的通透性增加,染色剂进入膜内,细胞被染成蓝色,而活细胞不被染色。如图 14.27(a)所示[245],K562 细胞在 DHAPS 两性离子仿生膜表面增殖 96 h 后,大部分细胞仍保持活性,仅有个别的细胞被染色;而 120 h 后,已有小部分的细胞明显被染成蓝色,说明部分细胞失去活性。随着培养时间进一步延长,越来越多的细胞被染色,细胞完全死亡。

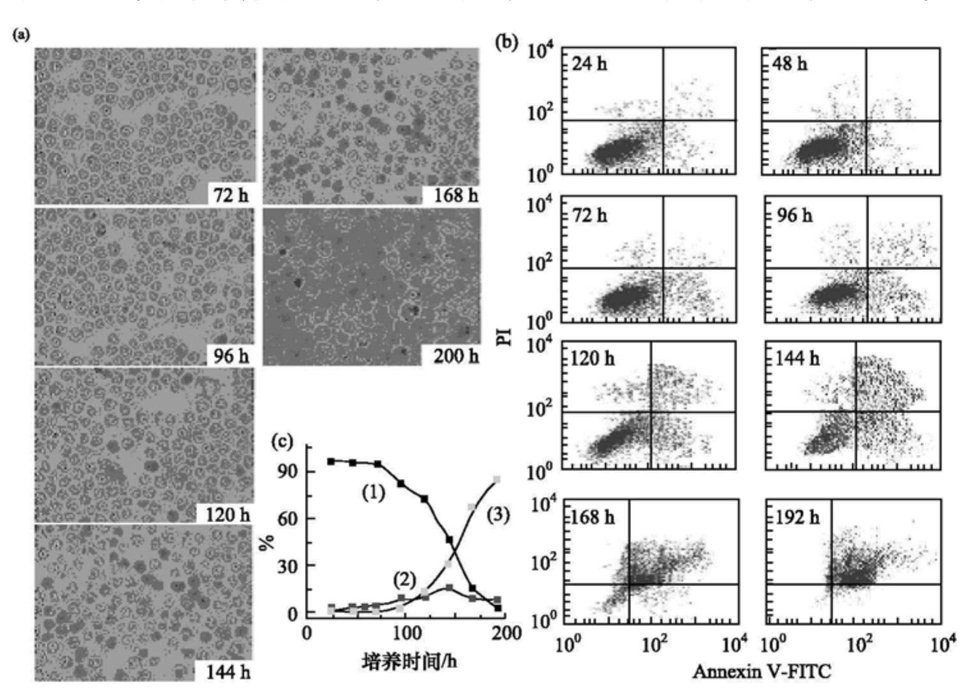


图 14.27　K562 细胞凋亡测定[245]

(a) K562 细胞在两性膜上增殖不同时间后的台盼蓝染色图片;(b) Annexin V-FITC 和 PI 双染色剂测量 K562 细胞活性;(c)细胞凋亡曲线:(1)活细胞;(2)早期凋亡细胞;(3)死细胞

膜联蛋白 V-FITC(Annexin V-FITC)和碘化丙锭(PI)双染色试剂可分析细胞的凋亡速率。在早期凋亡时,仅仅是细胞膜受到损伤,细胞仍保持完整的结构,只被 Annexin V-FITC 染色;而当细胞走向晚期凋亡即死亡时,细胞的整体结构被破坏,细胞核也受到损伤,被 Annexin V-FITC 和 PI 两种试剂同时染色;只有当细胞完全保持其活性时才能不被染色。细胞在三个象限的移动表明细胞从活性状态逐

步走向早期凋亡最后到晚期凋亡直至死亡。图 14.27(b)表明 95%的细胞在 72 h 内完全保持活性；到 96 h 时仅有 8%的细胞表现出早期凋亡，3%的细胞处于晚期凋亡；到 120 h 后仍有 72%的细胞保持了活性，仅有 13%的细胞死亡，说明大部分细胞在仿生膜表面能保持活性和完整结构达 120 h。随着培养时间增加，活细胞的个数明显减少，168 h 后 85%的细胞已经死亡。K562 细胞在仿生膜上的凋亡曲线如图 14.27(c)所示。因此，带有磺胺两性离子的仿生膜对 K562 细胞的生长没有任何毒害作用，从而有效地促进了细胞的增殖。

图 14.28 的测定结果表明，K562 细胞膜表面特异性分化抗原如 CD_{13}、CD_{15} 和 CD_{33} 的荧光强度在增殖前后基本相同，说明 K562 细胞在仿生膜界面增殖前后没有分化。因此该生物相容性界面促进了细胞的吸附和增殖，也抑制了细胞分化[245]。

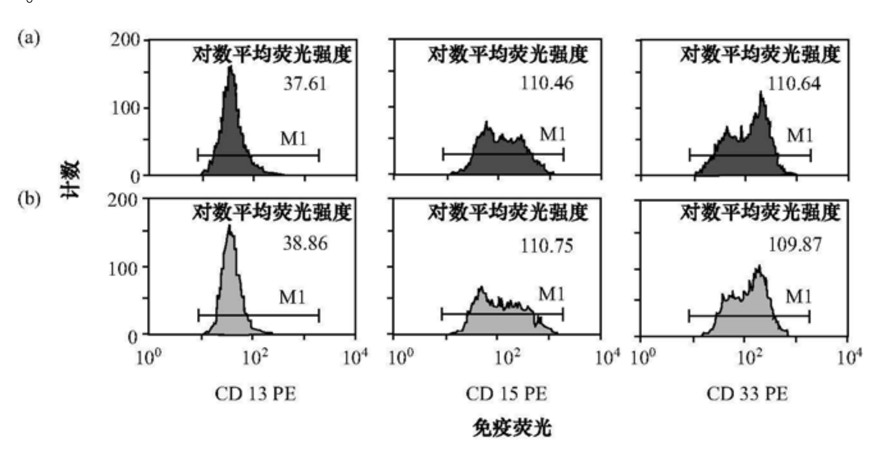


图 14.28　流式细胞仪分析 K562 细胞表面三种特异性分化抗原[245]

(a)增殖前；(b)增殖后

所有这些研究成果显示，生物材料的表面修饰对研究界面与蛋白质、细胞之间相互作用的本质具有巨大的潜力和广泛的应用前景。

电化学方法包括循环伏安和阻抗方法，可用于研究细胞在仿生界面的增殖[245]。从理论上讲，电化学活性物质的电子传递速率或电子传递阻抗与电极表面的性质密切相关。如图 14.29 所示，以 $K_3Fe(CN)_6$ 作为电化学活性探针，其在不同的修饰电极表面的循环伏安图有着明显的不同。$K_3Fe(CN)_6$ 在裸电极表面给出一对可逆的氧化还原峰，峰电位差(ΔE_p)小于 70 mV，在修饰了 DHAPS 膜后，峰形没有明显的变化，而当 K562 细胞在电极表面增殖达 48 h 时，$K_3Fe(CN)_6$ 在 K562 细胞/两性膜/GCE 表面的可逆性大大降低，氧化还原峰电流降低了约 50%，ΔE_p 明显增大。继续使细胞增殖，发现峰电流下降更多，ΔE_p 增大更显著，

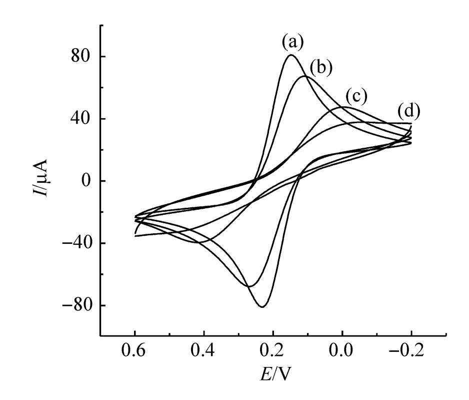


图 14.29　$K_3Fe(CN)_6$ 在不同膜修饰电极表面的循环伏安图(扫速:5 mV · s^{-1})
(a) 裸电极;(b) 两性膜修饰电极;(c) K562 细胞在两性膜修饰电极表面增殖 48 h;(d) K562 细胞在两性膜修饰电极表面增殖 96 h

峰形变得很差,说明细胞吸附到电极表面后,电极的界面阻抗增加,从而阻碍了电活性物质的电子传递。

由于细胞膜具有绝缘性,吸附于电极表面的细胞在数量、生长状况、形态上的变化都会影响电极的界面性质(电子传递电阻、电容等),通过氧化还原探针可以有效地检测到这些性质的变化。图 14.30 显示 $K_3Fe(CN)_6$ 在裸电极表面电子传递很快,电子传递电阻(R_{ct})仅 26 Ω,电极表面修饰了仿生膜后其 R_{ct} 没有明显的变化,说明 DHAPS 膜对电活性物质的电子传递没有影响。而细胞增殖后,测定的 R_{ct} 显著增大,电极界面阻抗逐渐变大,从 24 h 到 140 h,R_{ct} 由 289 Ω 增加到 2808 Ω(图 14.30 插图 1),证明细胞膜电阻影响了整个系统的电子传递电阻。140 h 后凋亡的细胞越来越多,聚集在电极表面导致了更大的电子传递电阻,阻碍了电活性探针的电化学过程(图 14.30 插图 2)。因此电化学阻抗为监测细胞的增殖与凋亡过程提供了良好的手段。

此外,细胞膜表面细胞黏附分子和细胞外基质分子的特异性作用是介导细胞生物行为的关键。细胞外介质黏附层和细胞表面的不同受体特异性结合,通过这些跨膜蛋白将信息传递到细胞内,影响细胞的基因表达和细胞骨架,决定细胞的存活、形态、功能、代谢、增殖、分化、迁移等基本生命活动。目前发现的细胞黏附分子,主要可分为整合素、钙黏素、选择素和免疫球蛋白家族,与之对应的细胞外基质包括胶原蛋白、弹性蛋白、纤黏蛋白、层黏连蛋白以及氨基聚糖和蛋白聚糖。通过分子设计合成细胞外基质中具有生物活性的短肽序列,并使其复合在材料表面,是构建生物相容性材料表面的有效方式,可有效诱导细胞膜表面细胞黏附分子的特异性识别,控制细胞在生物材料表面的行为。

14.4.7　细胞膜上蛋白质的电化学免疫分析

肿瘤抗原(tumor antigen)是指细胞癌变过程中出现的新抗原及过度表达的抗原物质的总称。肿瘤的抗原性是肿瘤免疫学的核心问题。大量研究工作证实,无论是化学物质还是病毒感染诱发的肿瘤都具有特异性的抗原。动物和人类自发的肿瘤也有抗原性,只是较弱。肿瘤抗原是在细胞恶性转化过程中,出现的具有免疫原性的蛋白类物质(少数为糖或脂肪与蛋白结合的分子)。

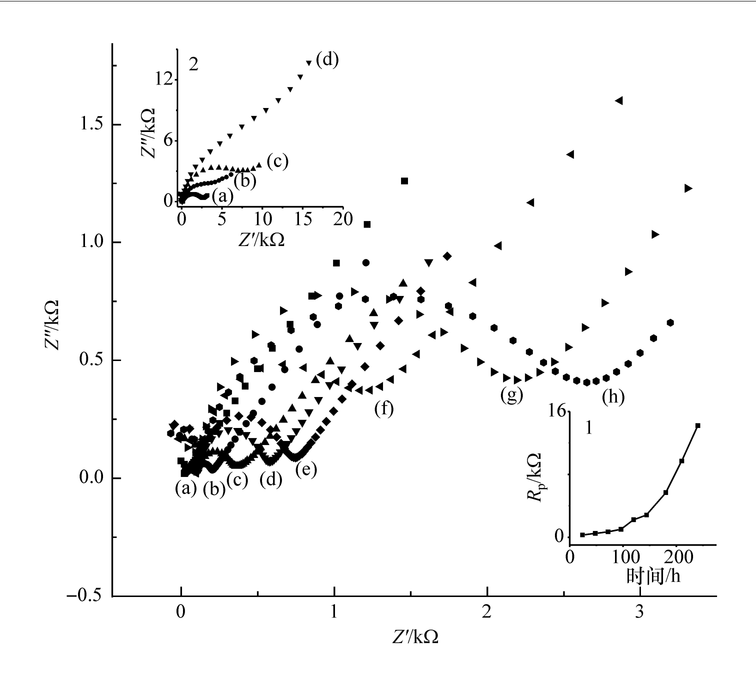


图 14.30　交流阻抗图谱

(a)裸电极;(b)两性膜修饰电极;(c)K562 细胞在两性膜修饰电极表面增殖 24h;(d)48 h;(e)72 h;(f)96 h;(g)120 h;(h)140 h(插图 1:电子传递电阻与细胞增殖时间的关系)。插图 2:K562 细胞在两性膜修饰电极表面增殖(a)140 h;(b)168 h;(c)180 h;(d)210 h

所谓肿瘤标志物(tumor marker)是指由肿瘤细胞产生的、与肿瘤的性质相关的物质,这些物质存在于肿瘤细胞的胞核、胞质和胞膜上或分泌在体液中,不存在于正常成人组织而见于胚胎组织,或在肿瘤组织中其含量超过正常含量,它们的存在或含量变化可以提示肿瘤的性质并有助于了解肿瘤的组织起源和细胞分化,从而帮助肿瘤的病理诊断、组织学分类、判断预后及指导临床治疗。此类肿瘤标志物可通过免疫组织化学方法检测,故称免疫组化标志物。

肿瘤标志物的电化学免疫分析技术是利用电化学技术简便、易行、价廉的特点,将其与免疫分析相结合的一种标记性的免疫分析,为肿瘤标志物和肿瘤细胞的检测提供了新方法。其标记物有酶和电活性物质两类。由于酶的化学放大作用,在电化学免疫分析中,大多采用酶作为标记物。常用于标记的酶有碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、乳酸脱氢酶、葡萄糖氧化酶、青霉素酰化酶和尿素水解酶等。在电化学酶联免疫分析中,常采用的电分析技术有循环伏安法和差分脉冲法等。作为电化学免疫分析中的标记酶必须具有如下性质:①高的催化活性和对底物的亲和性;②产物有电化学活性;③酶底物和酶在缓冲溶液中性质稳定;④酶产物的副反应很少。利用酶标抗体,一系列肿瘤标志物的电化学免疫分析方法已被建立。例

如,鞠熀先研究组近年来在这方面开展了系列性工作,提出了甲胎蛋白的电化学检测方法,检测灵敏度比常用的分光光度法提高了 1 个数量级[246],发展了 CEA 的固相免疫电化学测定方法[247],研制出快速、无需媒介体加入的免分离测定血浆中 CEA 的免疫电化学传感器[248],建立了 CA19-9、CA125 和 HCG 3 种肿瘤标志物的电化学免疫分析方法[249~251],为肿瘤标志物的免疫检测提供了新途径。

随着临床诊断的需要,目前已出现了全自动免疫分析仪,但可检测项目有限,仪器和试剂相当昂贵,难以推广使用,因而在恶性肿瘤的早期诊断、预后监测和大规模筛查方面的应用受到限制。发展新的免疫检测技术,降低检测成本,简化检测步骤,加快检测速度,提高检测的灵敏度、准确性,研制微型便携式检测仪器以适应对恶性肿瘤的早期诊断和预后监测的需要是亟待解决的问题。鞠熀先研究组综合流动注射技术和化学发光免疫分析的优点,建立了柱后 AFP[252] 和在柱 CEA[253] 的流动注射化学发光免疫分析方法,利用壳聚糖膜在碳印刷电极表面固定 HRP 标记 AFP 抗体发展了 AFP 免疫传感芯片[254],研制成化学发光传感膜,提出 CA19-9 的测定方法[255]。

金胶纳米粒子的电化学行为研究和在电化学传感器研制方面已得到快速发展,鞠熀先等利用金胶纳米粒子在电极表面形成生物相容界面,建立了一种肿瘤细胞表面分化抗原的原位电化学免疫检测新方法,其原理如图 14.31 所示[242]。该方法结合免疫分析方法,通用两步温育反应首先将 P-gp 抗体键合到细胞膜上,然后进一步温育碱性磷酸酶(AP)标记二抗将 AP 引入到电极表面,催化底物 1-萘酚磷酸酯的水解。水解反应产生的电化学活性物质的安培响应的大小与细胞表面分化P-gp抗原的表达多少直接相关,可进行 K562/ADM 白血细胞表面抗原的分析检测和细胞浓度定量测定,与临床上常用的流式细胞仪测定分析得到了一致的结果。在优化的实验条件(5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ P-gp 一抗和 2 $\mu g \cdot mL^{-1}$ AP 标记二抗,温育时间 60 min,温育温度 35℃,pH 7.4 PBS 温育液)下,催化电流与细胞数的对数在细胞浓度为 $5.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$ 个细胞 · ml^{-1} 范围内呈良好的线性关系,该方法能检测到细胞的最低浓度为 1.0×10^4 个细胞 · ml^{-1}(图 14.32)。此方法利用电化学分析简便、易行、价廉的特点,结合免疫分析高选择性、高灵敏度检测,发展了肿瘤细胞免疫表达和细胞因子的原位电化学免疫检测新技术,可望实现临床肿瘤细胞表面各种蛋白质的快速测定,为肿瘤疾病的早期诊断与治疗提供了新途径。

14.4.8　肿瘤细胞生长及药物抑制作用的分析

用于药物灵敏度检测的活细胞电化学行为包括:细胞电活性中心的电子转移[256]、细胞/传感器界面的开路电位[257]、电细胞-基质阻抗[258]、使用扫描电化学显微镜获得活细胞呼吸活性图像[259]。

细胞内电子电荷跨膜传输行为具有重要意义,特别是利用这一性质可以研究

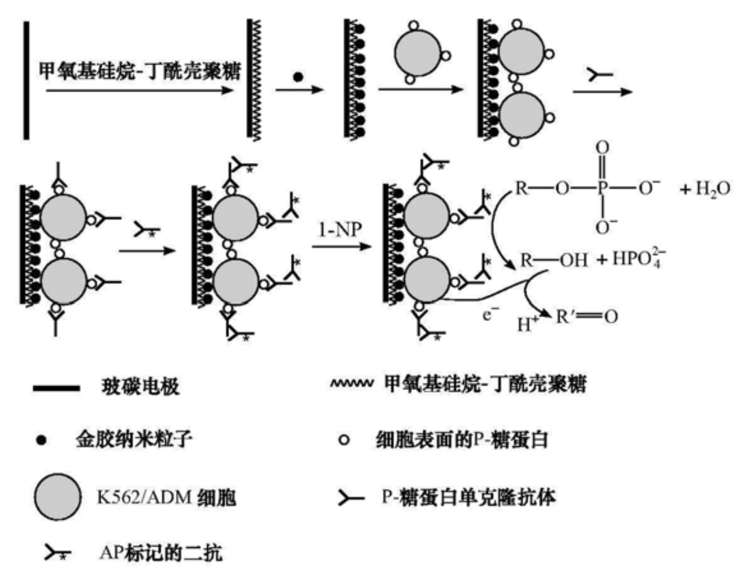


图 14.31　K562/ADM 细胞膜表面 P-gp 蛋白质电化学免疫检测原理[242]

抗癌药物对肿瘤细胞的电化学行为的影响、肿瘤细胞的生长以及药物对肿瘤细胞的作用，是细胞生物学、细胞药理学、细胞免疫学研究中的重要领域。慈云祥课题组考察了金属硫蛋白、维生素类药、5F-U抗代谢类药、Vp16 凋亡类药和血小板生成促进因子(thrombopoietin，TPO)、细胞生长因子等对细胞生长的促进及抑制的作用[260]。药物对细胞内代谢系统的抑制，很可能是蛋白质结构的改变所带来的影响。其中影响之一是镶嵌在电子传递蛋白的辅基，在原位点从底物处获得电子，并将其传输到另一反应的电子受体时，电子传递蛋白结构上的变化将影响这种传递的性质。例如，在研究 5-氟脲嘧啶对 HL-60 细胞及凋亡药物 Vp16 对 K562 白血细胞的药物作用时，发现癌细胞在分裂前其电化学行为就发生了显著的变化，尤其是 Vp16 仅在1.5h内就对 K562 白血

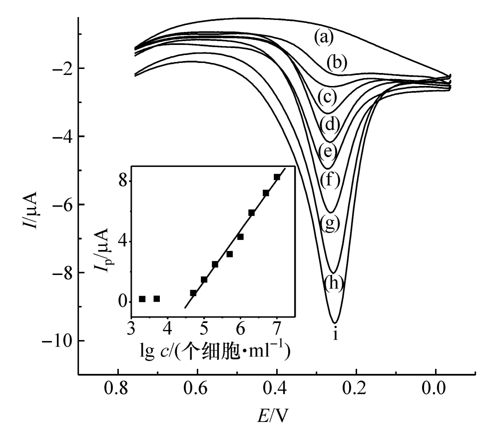


图 14.32　固定不同浓度细胞后的 DPV 测量曲线

(a)0 个细胞·ml^{-1}；(b)5.0×10^4 个细胞·ml^{-1}；(c)1.0×10^5 个细胞·ml^{-1}；(d)2.0×10^5 个细胞·ml^{-1}；(e)5.0×10^5 个细胞·ml^{-1}；(f)1.0×10^6 个细胞·ml^{-1}；(g)2.0×10^6 个细胞·ml^{-1}；(h)5.0×10^6 个细胞·ml^{-1}；(i)1.0×10^7 个细胞·ml^{-1}。插图：DPV 峰电流与细胞浓度的对数的关系

细胞表现出药物的作用[256, 260]。

很多药物可以改变肿瘤细胞的生物生理活性。按照对生物大分子的作用，抗癌药物一般可以分为4类[261]：①影响核酸生成的药物，如阻止嘧啶类核苷酸形成的抗代谢物，常见药物有5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil，5-FU)等；②直接破坏DNA并阻止其复制的药物，如抗生素类，常见药物有丝裂霉素C(mitomycin，MMC)等；③干扰转录过程阻止RNA合成的药物，常见药物有阿霉素(adriamycin，ADM)等；④影响蛋白质合成的药物，如影响纺锤丝合成的药物，常见药物有长春新碱(vincristine，VCR)等。不同种药物对肿瘤细胞的电化学响应有不同的影响，进而可以比较不同种药物的药效并进行抗癌药物的筛选。与常规临床筛选方法相比，采用电化学方法对抗癌药物进行筛选，可以节省成本、减少操作步骤、提高灵敏度，是一个应用前景广阔的领域。

Woolley[257]提出了一种通过用电化学方法实时检测细胞行为来研究抗癌药物对人卵巢癌细胞株A2780细胞及其阿霉素诱导变种的作用的新方法。附着在金电极表面的细胞改变了细胞外的微环境，在电极界面上产生了一个不同于本体培养液的电化学电势。附着的细胞产生一个−100 mV的开路电位(open circuit potential，OCP)，而无细胞附着时开路电位为−15 mV，将细胞用抗癌药物阿霉素、长春碱处理24h后，开路电位正移。

最近，Chen等[262]利用多壁碳纳米管(multiwall carbon nanotube，MWNT)来促进细胞的活性中心和电极间的电子传递，考察了几种抗肿瘤药物对肿瘤细胞的灵敏度，提出了电化学药敏检测新方法。

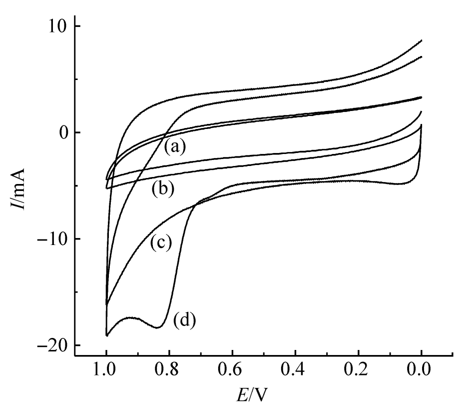


图14.33　循环伏安图(扫速：50 $mV \cdot s^{-1}$)
(a)裸GCE；(b)MWNT/GCE在pH7.4 PBS中；(c)裸GCE；(d)MWNT/GCE在含有K562细胞的pH 7.4 PBS中[262]

用pH 7.4 PBS配制的白血病K562细胞悬浊液在裸的玻碳电极和MWNT修饰的玻碳电极上的循环伏安图如图14.33所示[262]。MWNT修饰的玻碳电极的背景电流[图14.33(b)]大于裸玻碳电极的背景电流[图14.33(a)]，这可能是由于修饰电极有较大的接触表面积。在50 $mV \cdot s^{-1}$下，白血病K562细胞悬浊液在+0.823 V显示出一个峰形良好的鸟嘌呤的阳极峰[图14.33(d)]，然而在裸玻碳电极上未观察到该峰[图14.33(c)]。考虑到K562细胞电极过程的不可逆性以及连续扫描后峰电流的降低，第一圈扫描的峰电流可以被用于抗肿瘤药物的细胞毒性的伏安法测定，因此也可以作为电

化学抗肿瘤药敏试验。

当用纯生化试剂 5-FU 来考察抗肿瘤药物对白血病 K562 肿瘤细胞活性的影响时发现，向培养基中加入 200 μg·ml^{-1} 5-FU后，K562 细胞的伏安信号有显著的变化(图 14.34 中插图所示)[262]。5-FU 的存在导致了 K562 肿瘤细胞峰电流的降低，表明了细胞活性的降低。这是因为 5-FU 是一种抗代谢药物，影响核酸的合成[263]。随着培养时间的增加，有药物加入培养以及无药物加入培养的 K562 肿瘤细胞溶液的峰电流都增加。然而，未加入药物培养的肿瘤细胞的峰电流比加入药物培养的细胞增加得快。培养细胞6 h后，两者的差异更为明显。培养 72 h 后，未加入药物培养的 K562 肿瘤细胞的峰电流趋于稳定值，并且，在培养 95 h 后峰电流降低[图 14.34(a)]。然而，加入药物培养的 K562 肿瘤细胞在培养 95 h 后峰电流趋向于一个稳定值，并且，直到培养 118 h 后才观察到峰电流降低[图14.34(b)]。通常，峰电流与细胞数和细胞质中表达的鸟嘌呤有关。如果细胞处于相同的生长期，细胞的伏安响应与细胞数呈线性关系[260]。随着培养时间的增加，未加药物培养的白血病 K562 肿瘤细胞的峰电流不再线性增加，而是培养 118 h 的细胞峰电流低于培养 95h 的细胞峰电流[图 14.34(a)]。这一现象可能是由细胞培养过程中的营养不足引起的。5-FU 的存在减低了细胞活性，所以加入 5-FU 培养的细胞比未加入药物培养的细胞较晚发生营养不足。因此，相比于未加入药物培养的细胞，所测得的加入 5-FU 培养的细胞的峰电流需要更长的时间才会降低。

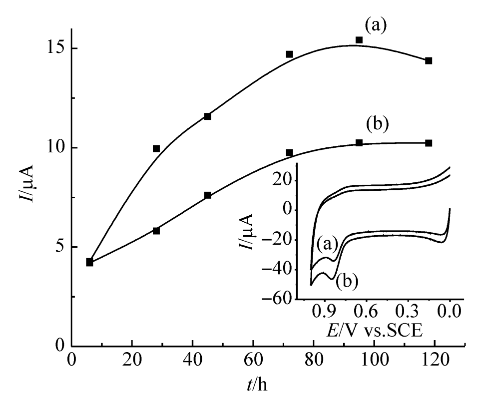


图 14.34　K562 细胞峰电流与抗肿瘤药物培养时间的依赖关系

(a)对照组，(b)加入 200μg·ml^{-1}5-FU。

插图：K562 细胞培养 72 h 后的循环伏安曲线：

(a)对照组；(b) 加入 200μg·ml^{-1}5-FU[262]

当向培养液中加入其他 3 种临床抗肿瘤药物(阿霉素、丝裂霉素和长春新碱)时也发现了细胞循环伏安信号的变化。这三种药物都显示了与 5-FU 相似的细胞毒效应趋势，并且与使用传统的体外 MTT 药敏试验所得的结果相一致，所以，电化学方法是一种可信赖的抗肿瘤药敏试验方法，可用于抗癌药物的电化学药敏检测。与 MTT 法相比，电化学方法降低了成本、减少了操作步骤，提高了灵敏度，具有广阔的应用前景。

14.4.9　细胞电化学的发展展望

细胞电化学是基于电化学原理、实验方法与细胞、分子生物学技术的相互结合

而产生的一个新的研究领域,具有非常美好的发展前景。其进一步的发展方向有:

(1) 运用现代科学理论和方法,构建或进一步完善细胞电化学理论体系。

(2) 与其他分析技术如原子力显微镜、扫描隧道显微镜、核磁共振光谱、拉曼光谱(Raman)等联用,结合自组装技术特别是纳米组装技术,研究细胞的电极过程及机制,探讨细胞内化学活性物质的电化学行为,解释生命过程中的电化学现象。

(3) 利用电化学探针检测细胞中特定物质的变化,通过酶联免疫以及 PCR 扩增技术进行生物放大,提高检测的准确性和灵敏度。

(4) 分析技术的微型化为细胞微环境分析提供了强有力的手段。结合这些微电极技术、微操作技术、微分离技术(如毛细管电泳、微柱液相色谱和微透析)、微进样技术等,利用微电极和生物功能微修饰电极,实现单细胞内抗原与细胞因子的原位检测,研究细胞增殖与分化过程中细胞因子的作用。

(5) 电化学生物传感器在提高选择性、灵敏度和使仪器小型化等方面具有独特的优越性。通过各种新技术、新材料的生物兼容性,发展细胞培养与固定的新方法,建立灵敏度高、重现性好、抗干扰能力强、电极寿命长的新型实用的细胞生物传感器和细胞分析传感器。

(6) 从细胞层面上揭示细胞内与细胞间物质、能量与信息的传输和分子识别机制,实现人工调控细胞增长与分化。将研究的"触角"深入小到细胞甚至亚细胞层次,研究细胞表面或细胞内生物分子间的通讯和相互作用,实现原位、实时、高选择性、高通量研究单个细胞生命过程的目的,从而了解单个活细胞内的单分子事件并实时跟踪其生命过程,为人类健康服务。

参 考 文 献

[1] Lillard S J. Yeung E S. Handbook of capillary electrophoresis. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997. 523

[2] Oates M D, Cooper B R, Jorgenson J W. *Anal. Chem*. 1990, **62**: 1573

[3] Olefirowicz T M, Ewing A G. *Chimia*. 1991, **45**: 106

[4] Lee T T, Yeung E S. *Anal. Chem*. 1992, 64: 3045

[5] Weng Q, Jin W *Anal. Chim. Acta*. 2003, **478**: 199

[6] Chen S, Lillard S J. *Anal. Chem*. 2001, **73**: 111

[7] Chiu D T, Lillard S J, Scheller R H et al. *Science*. 1998, **279**: 1190

[8] Krylov S N, Starke D A, Arriaga E A et al. *Anal. Chem*. 2000, **72**: 872

[9] Chen D, DovichI N J. *Anal. Chem*. 1996, **68**: 690

[10] Luzzi V, Lee C L, Allbritton N L. *Anal. Chem*. 1997, **69**: 4761

[11] Olsson J, Nordström O, Nordström A C et al. *J. Chromatogr. A*. 1998, **826**: 227

[12] 肖玉秀, 冯钰锜, 达世禄等. 化学进展. 2004, **16**: 543

[13] Weng Q, Xia F, Jin W. *J. Chromatogr. B*. 2002, **779**: 347

[14] Dong Q, Wang X, Zhu L et al. *J. Chromatogr. A*. 2002, **959**: 269

[15] Jin W, Dong Q, Ye X et al. *Anal. Biochem*. 2000, **285**: 255
[16] Xue Q, Yeung E S. *J. Chromatogr. B*. 1996, **677**: 233
[17] Sims C E, Meredith G D, Krasieva T B et al. *Anal. Chem*. 1998, **70**: 4570
[18] Han F, Wang Y, Sims C E et al. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 3688
[19] Zhang Z, Krylov S, Arriaga E A et al. *Anal. Chem*. 2000, **72**: 318
[20] Yang Q, Krautmacher C, Schilling D. *Biomed. Chromatogr*. 2002, **16**: 224
[21] Hu S, Zhang L, Cook L M et al. *Electrophoresis*. 2001, **22**: 3677
[22] Yeung E S. *J. Chromatogr. A*. 1999, **830**: 243
[23] Tong W, Yeung E S. *J. Chromatogr. B*. 1996, **685**: 35
[24] W Tong, Yeung E S. *J. Chromatogr. B*. 1997, **689**: 321
[25] Chang H T, Yeung E S. *Anal. Chem*. 1995, **67**: 1079
[26] Lillard S J, Yeung E S, McCloskey M A. *Anal. Chem*. 1996, **68**: 2897
[27] Anderson A B, Gergen J, Arriaga E A. *J. Chromatogr. B*. 2002,**769**: 97
[28] Kim W S, Dahlgren R L, Moroz L L et al. *Anal. Chem*. 2002, **74**: 5614
[29] Zabzdyr J L, LillarD S J. *Anal. Chem*. 2001, **73**: 5771
[30] Arlt K, Brandt S, Kehr J. *J. Chromatogr. A*. 2001, **926**: 319
[31] Orwar O, Fishman H A, Ziv N E et al. *Anal. Chem*. 1995, **67**: 4261
[32] Malek A, Khaledi M G. *Anal. Biochem*. 1999, **270**: 50
[33] Hu S, Lee R, Zhang Z et al. *J. Chromatogr. B*. 2001, **752**: 307
[34] Hu S, Zhang L, Krylov S et al. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 3495
[35] Zabzdyr J L, Lillard S J. *J. Chromatogr. A*. 2001, **911**: 269
[36] Han F, Lillard S J. *Anal. Chem*. 2000, **72**: 4073
[37] Feltus A, Hentz N G, Daunert S J. *J. Chromatogr. A*. 2001, **918**: 381
[38] Wallingford R A, Ewing A G. *Anal. Chem*. 1988, **60**: 1972
[39] 胡深，庞代文，王宗礼等. 分析化学. 1998, **26**: 752
[40] Jin W, Li W, Xu Q. *Electrophoresis*. 2000, **21**: 774
[41] Weng Q, Jin W. *Electrophoresis*. 2001, **22**: 2797
[42] Dong Q, Jin W. *Electrophoresis*. 2001, **22**: 2786
[43] Jin W, Jiang L. *Electrophoresis*. 2002, **23**: 2471
[44] Jin W, Li X, Gao N S. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 3859
[45] Swanek F D, Chen G, Ewing A G. *Anal. Chem*. 1996, **68**: 3912
[46] Hofstadler S A, Severs J C, Smith R D et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 1996, **10**: 919
[47] Cao P, Moini M J . *AM Soc. Mass Spectro*. 1999, **10**: 184
[48] Moini M, Demars S M, Huang H. *Anal. Chem*. 2002, **74**: 3772
[49] Page J S, Rubakhin S S, Sweedler J V. *Analyst*. 2000, **125**: 555
[50] Page J S, Rubakhin S S, Sweedler J V. *Anal. Chem*. 2002, **74**: 497
[51] Cruz L, Moroz L L, Gillette R et al. *J. Neurochem*. 1997, **69**: 110
[52] Bazzanella A, Lochmann H, Tomos A D et al. *J. Chromatogr. A*. 1998, **809**: 231
[53] Lochmann H, BazzanellA, Kropsch A S et al. *J. Chromatogr. A*. 2001, **917**: 311
[54] Rosenzweig Z, Yeung E S. *Anal. Chem*. 1994, **66**: 1771
[55] Tan W H, Yeung E S. *Anal. Biochem*. 1995, **226**: 74

[56] Tracht S, Toma V, Sweedler J V. *Anal. Chem*. 1994, **66**: 2382
[57] Luzzi V, Sims C E, Soughayer J S et al. *J. Biol. Chem*. 1998, **273**: 28657
[58] Stephens D J, Allen V J. *Science*. 2003, **300**: 82
[59] Lippincott-Schwartz J, Patterson G H. *Science*. 2003, **300**: 87
[60] Rieder C L, Khodjakov A. *Science*. 2003, **300**: 91
[61] Weijer C J. *Science*. 2003, **300**: 96
[62] Swedlow J R, Goldberg I, Brauner E et al. *Science*. 2003, **300**: 100
[63] 程介克. 单细胞分析. 北京:科学出版社, 2005
[64] Tan W H, Parpura V, Haydon P G et al. *Anal. Chem*. 1995, **67**: 2575
[65] Biran I, Walt D R. *Anal. Chem*. 2002, **74**: 3046
[66] Pereira-Rodrigues N, Zurgil N, Chang S C et al. *Anal. Chem*. 2005, **77**: 2733
[67] Dubsertret B, Skourides P, Norris D J et al. *Science*. 2002, **298**: 1759
[68] 朱珊珊, 黄志江.《国外医学》麻醉学与复苏分册. 2005, **26**: 118
[69] Chiu D T, Wilson C F, Ryttsé n F et al. *Science*. 1999, **283**: 1892
[70] Song S H, Stevens C F, Gage F H. *Nature*. 2002, **417**: 39
[71] Fuller K M, Arriaga E A. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 2123
[72] Qian W J, Gee K R, Kennedy R T. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 3468
[73] Bousso P, Bhakta N R, Lewis R S et al. *Science*. 2002, **296**: 1876
[74] Trachtensberg J T, Chen B E, Knott G W et al. *Nature*. 2002, **420**: 788
[75] Grutzendler J, Kasthuri N, Gan W B. *Nature*. 2002, **420**: 812
[76] Ishijima A, Yanagid T A. *Trends Biochem. Sci*. 2001, **26**: 438
[77] Wu Z X, Xia S, Xu L et al. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2003, **35**: 381
[78] Lakowicz J R, Szmacinski H, Nowaczyk K et al. *Anal. Biochem*. 1992, **202**: 316
[79] Pepperkok R, Squire A, Geley S et al. *Curr. Biol*. 1999, **9**: 269
[80] SquireT N, HansraA G, BornancinF et al. *Science*. 1999, **283**: 2085
[81] Knemeyer J P, Herten D P, Sauer M. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 2147
[82] Tamiya E, Iwabuchi S, Nagatani N et al. *Anal. Chem*. 1997, **69**: 3697
[83] Eigen M, Rigler R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, **91**: 5740
[84] Schwille P, MeyerAlmes F J, Rigler R. *Biophys. J*. 1997, **72**: 1878
[85] Pramanik A, Rigler R. *Biol. Chem*. 2001, **382**: 371
[86] Zhong Z H, Pramanik A, Ekberg K et al. *Dabetologia*. 2001, **44**: 1184
[87] Pramanik A, Olsson M, Langel U et al. *Biochemistry*. 2001, **40**: 10839
[88] Wachsmuth M, Waldeck W, Langowski J. *J. Mol. Biol*. 2000, **298**: 677
[89] Kim S A, SchwillE P. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2003, **13**: 583
[90] Liu H Y, Fan F R F, Lin C W et al. *J. Am. Chem. Soc*. 1986, **108**: 3838
[91] Bard A J, Fan F R F, Kwak J et al. *Anal. Chem*. 1989, **61**: 132
[92] Kwak J, Bard A J. *Anal. Chem*. 1989, **61**: 1221
[93] 张礼和, 王梅祥. 化学生物学进展. 北京:化学工业出版社, 2005. 414
[94] Mirkin M V, Horrocks B R. *Anal. Chim. Acta*. 2000, **406**: 119
[95] Bard A J, Fan F R F, Pierce D T et al. *Science*. 1991, **254**: 68
[96] Toth K, Wei C, Bard A J. *Electroanalysis*. 1995, **7**: 801

[97] Lee C, Kwak J, Bard A J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990, **87**: 1740

[98] Yasukawa T, Kondo Y, Uchida I et al. *Chem. Lett*. 1998, **8**: 767

[99] Yasukawa Y, Kaya T, Matsue T. *Electroanalysis*. 2000, **12**: 653

[100] Cai C, Liu B, Mirkin M V et al. *Anal. Chem*. 2002, **74**: 114

[101] Liebetrau J M, Miller H M, Baur J E et al. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 563

[102] Kurulugama R T, Wipf D O, Takacs S A et al. *Anal. Chem*. 2005, **77**: 1111

[103] Lee Y, Ding Z, Bard A J. *Anal. Chem*. 2002, **74**: 3634

[104] Horrocks B R, Schmidtke D, Heller A et al. *Anal. Chem*. 1993, **65**: 3605

[105] Jalili N, Laxminarayana K. *Mechatronics*. 2004, **14**: 907

[106] Czajkowsky D M, Iwamoto H, Shao Z F. *J. Electron Microscopy*. 2000, **49**: 395

[107] 郁毅刚，徐如祥，蔡颖谦等. 第一军医大学学报. 2005, **25**: 3

[108] Bernd R. *Anal. Quant. Cytol. Histol*. 1998, **20**: 97

[109] Nowakowski R, Luckham P, Winlove P. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2001, **1514**: 170

[110] Girasole M, Gricenti A, Generosi R et al. *J. Microsc.-Oxford*. 2001, **204**: 46

[111] Melling M, HochmeisterS, BlumerR et al. *Neuroimage*. 2001, **14**: 1348

[112] Braet F, Vermijlen D, BossuytV et al. *Ultramicroscopy*. 2001, **89**: 265

[113] Nagao E, Nishijima H, Akita S et al. *Electron Microsc*. 2000, 49: 453

[114] Tollersrud T,BergeT, AndersenS R. *APMIS*. 2001, **109**: 541

[115] SatoM, NagayamaK, KataokaN et al. *J. Biomechanics*. 2000, **33**: 127

[116] Hendson E, Haydon P G, Sakaguchi D S. *Science*. 1992, **257**: 1944

[117] Mathur A B,CollinsworthA M, ReichertW M et al. *J. Biomech*. 2001, **34**: 1545

[118] AntoniK M D. *IEEE Eng Med Biol*. 1997, **16**: 66

[119] Braet F, Zanger R D,Seynaeve C et al. *J. Electron. Microsc*. 2001, **50**: 283

[120] Haeberle W, Hoerber J K H, Ohnesorge F. *Ultramicroscopy*. 1992, **42～44 (part 2)**: 1161

[121] Ohnesorge F M, Horber J K H, Haberle W et al. *Biophys. J*. 1997, **73**: 2183

[122] Ludwig M, Dettmann W, Gaub H E. *Biophys. J*. 1997, **72**: 445

[123] Lehenkari P P, Charras G T, NykanenA et al. *Ultramicroscopy*. 2000, **82**: 289

[124] Thie M, Rospel R, Dettmann W et al. *Hum. Reprod*. 1998, **13**: 3211

[125] Wightman R M, Wipf D O. *Electroanal. Chem*. 1989, **15**: 267

[126] Amatore C, Maisonhaute E. *Anal. Chem*. 2005, **77**: 303

[127] Baltes N, Thouin L, Amatore C et al. *Angew. Chem. Int. ED EngL*. 2004, **43**: 1431

[128] Dobson P S, Weaver J M R, Holder M N et al. *Anal. Chem*. 2005, **77**: 424

[129] Strein T G, Ewing E W. *Anal. Chem*. 1992, **64**: 1368

[130] Kawagoe K T, Jankowski J A, Wightman R M. *Anal. Chem*. 1991, **63**: 1589

[131] Schuite A, Chow R H. *Anal. Chem*. 1998, **70**: 985

[132] Zhang X J, Zhang W M, Zhou X Y. *Anal. Chem*. 1996, **68**: 3338

[133] 黄卫华，庞代文，王宗礼等. 高等学校化学学报. 2001, **22**: 1561

[134] Huang W H, Pang D W, Tong H et al. *Anal. Chem*. 2001, **73**: 1048

[135] Holt K B, Bard A J. *Biochemistry*. 2005, **44**: 13214

[136] Mauzeroll J, Bard A J, Owhadian O et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004, **101**: 17582

[137] ArbaultS, Sojic N, Bruce D et al. *Carcinogenesis*. 2004, **25**: 509

[138] Adams R N. *Anal. Chem*. 1976, **48**: 1128A

[139] Venton B J, Wightman R M. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 414A

[140] Wightman R M, Jankowski J A, Kennedy R T et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991, **88**: 10754

[141] Michael D J, Wightman R M. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 1999, **19**: 33

[142] Chen P, Xu B, Tokranova N et al. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 518

[143] Hengstenberg A, Blochl A, Dietzel I D et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 40: 905

[144] Liebetrau J M, Miller H M, Baur J E et al. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 563

[145] Cragg S J, Rice M E. *Trends Neurosci*. 2004, **27**: 270

[146] Adams R N. *Prog. Neurobiol*. 1990, **35**: 297

[147] Kennedy R T, Huang L, AspinwalL C A. *J. Am. Chem. Soc*. 1996, **118**: 1795

[148] Troyer K P, Wightman R M. *J. Biol. Chem*. 2002, **277**: 29101

[149] Hafez I, Kisler K, Berberian K et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005, **102**: 13879

[150] Mosharov E V, Gong L W, Khanna B et al. *J. Neurosci*. 2003, **23**: 5835

[151] Hochstetler S E, Puopolo M, Gustincich S et al. *Anal. Chem*. 2000, **72**: 489

[152] Travis E R, Wightman R M. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*. 1998, **27**: 77

[153] Colliver T L, Hess E J, Pothos E N et al. *J. Neurochem*. 2000, **74**: 1086

[154] Chow R H, Ruden L V, Neher E. *Nature*. 1992, **356**: 60

[155] Staal R G W, Mosharov E V, Sulzer D. *Nat. Neurosci*. 2004, **7**: 341

[156] Finnegan J M, Pihel K, Cahill P S et al. *J. Neurochem*. 1996, **66**:1914

[157] Chen T K, Luo G, Ewing A G. *Anal. Chem*. 1994, **66**: 3031

[158] Zerby S E, Ewing A G. *J. Neurochem*. 1996, **66**: 651

[159] 黄卫华，张丽瑶，程伟等.高等学校化学学报. 2003, **24**: 425

[160] Chen R S, Huang W H, Tong H et al. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 6341

[161] Chen G, Gavin P F, Luo G et al. *J. Neurosci*. 1995, **15**: 7747

[162] Chen G, Gutman D A, Zerby S E et al. *Brain Res*. 1996, **733**: 119

[163] Zhou Z, Misler S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, **92**: 6938

[164] Jackson B P, Dietz S M, Wightman R M. *Anal. Chem*. 1995, **67**: 1115

[165] Pihel K, Hsieh S, Jorgenson J W et al. *Anal. Chem*. 1995, **67**: 4514

[166] Huang L, Kennedy R T. *Trends Anal. Chem*. 1995, **14**:158

[167] Aspinwall C A, Brooks S A, Kennedy R T et al. *J. Bio. Chem*. 1997, **272**: 31308

[168] Qian W J, Aspinwall C A, Battiste M A et al. *Anal. Chem*. 2000, **72**: 711

[169] Malinski T, Taha Z. *Nature*. 1992, **358**: 676

[170] Trumpower B L. *J. Biol. Chem*. 1990, **256**: 11409

[171] Pinder J C. *Biochem. Soc. Trans*. 1991, **19**: 1039

[172] 高体玉，冯军，慈云祥. 化学进展. 1998, **10**: 305

[173] Pethig P, Szent-Gyoryi A. *In*: Keyzer H, Gutman F. Bioelectrochemistry. New York: Plenum Press, 1980. 227

[174] Li W, Feng J, Yang H Q, Ci Y X. *Chinese Chem. Lett*. 1997, **8**: 1071

[175] Berry M N, Grivell A R, Wallace P G. *In*: Srinivasan S, Chizmadzhev Y A, Bockris J O'M et al. Electrochemical Aspects of Metabolism, in Comprehensive treatise of Eletrochemistry. New York and

London：Plenum Press，1985. 348

[176] Compton R G，Perkin S J，Gamblin D P et al. *New J. Chem.* 2000，**24**：179

[177] Li H N，Ci Y X. *Anal. Chim. Acta.* 2000，**416**：221

[178] Hobson N S，Tothill I，Turner A P F. *Biosens. Bioelectron.* 1996，**5**：455

[179] Matsunaga T，Namba Y. *Anal. Chem.* 1984，**56**：798

[180] Ci Y X，Feng J，Jiang Z W et al. *Bioelectrochem. Bioener.* 1997，**43**：293

[181] Matsunaga T，Nakajima T. *Appl. Environ. Microb.* 1985，**50**：238

[182] Han S，Li X，Guo G et al. *Anal. Chim. Acta.* 2000，**405**：115

[183] Armon R，Starosvetsky J，Dancygier M et al. *Biofouling.* 2001，**17**：289

[184] Busalmen J P，Sanchez S R. *Appl. Environment. Microbiol.* 2001，**67**：3188

[185] Turner A P F，Ramsay G，Higgins I. J. *Biochem. Soc. T.* 1983，**11**：455

[186] Ertl P，Unterladstaetter B，Bayer K et al. *Anal. Chem.* 2000，**72**：4949

[187] Kuznetsov B A，Davydova M E，Shleeva M O et al. *Bioelectrochemistry.* 2004，**64**：125

[188] Du D，Liu S L，Chen J et al. *Biomater.* 2005，**26**：6487

[189] Hiromoto S，Noda K，Hanawa T. *Electrochimica Acta.* 2002，**48**：387

[190] Pethig R. Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials. Wiley，New York，1979

[191] Borkholder D A. Cell based Biosensor Using Microelectrodes. Doctoral Dissertation，Standford University，1998

[192] Ehret R，Baumann W，Brischwein M et al. *Biosens. Bioelectron.* 1997，**12**：29

[193] Ehret R，Baumann W，Brischwein M et al. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998，**36**：365

[194] Ruan C，Yang L，Li Y. *Anal. Chem.* 2002，**74**：4814

[195] Patolsky F，Zayats M，Katz E et al. *Anal. Chem.* 1999，**71**：3171

[196] Yang L J，Li Y B. *Biosens. Bioelectron.* 2005，**20**：1407

[197] Gingell D. Cell contact with solid surfaces. In：Glaser R，Gingell，D. Biophysics of the Cell Surface. Springer，New York，1990. 263

[198] Yang L，Li Y，Erf G F. *Anal. Chem.* 2004，**76**：1107

[199] Huang H H. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 2004，**314**：787

[200] Keese C R，Giaever I. *IEEE Eng. Med. Boil.* 1994，**13**：402

[201] Wegener J，Hakvoort A，Galla H J. *Brain Res.* 2000，**853**：115

[202] Arndt S，Seebach J，Psathaki K et al. *Biosens. Bioelectron.* 2004，**19**：583

[203] Tiruppathi C，Malik A B，Del Vecchio P J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992，**89**：7919

[204] Lo C M，Keese C R，Giaever I. *Exp. Cell Res.* 1994，**213**：391

[205] Reddy L，Wang H S，Keese C R et al. *Exp. Cell Res.* 1998，**245**：360

[206] Humphrey C E，Seal E. *Science.* 1959，**130**：388

[207] Schauble M K，Habal M B，Gullick H D. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1977，**101**：294

[208] Habal M B. *J. Biomed. Mater. Res.* 1980，**14**：789

[209] Morris D M，Marino A A，Gonzalez E. *J. Surg. Res.* 1992，**53**：306

[210] Wemyss-Holden S A，Robertson G S M，Hal P D L et al. *Dig. Dis.* 2000，**18**：50

[211] Turler A，Schaefer H，Schaefer N et al. *J. Scand. Gastroenterol.* 2000，**35**：322

[212] Finch J G，Fosh B，Anthony A et al. *Clin. Sci.* (LonD). 2002，**102**：389

[213] Nordenstrom B E. Biologically Closed Electric Circuits：Clinical，Experimental and Theoretical Evi-

dence for an Additional Circulatory System. Nordic Medical Publications, Stockholm, 1983
[214] Vijh A K. *Drying Technol*. 1999, **17**: 585
[215] Berg H. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1992, **27**: 89
[216] Nickoloft J. *Methods in Molecular Biology*. VoL 47. New Jersey, Humana Press, 1995
[217] Zhang L, Berg H. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1992, **28**: 341
[218] Kwee S, Raskmark P. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1995, **36**: 109
[219] Fiedler U, Grobne R U, Berg H. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1995, **38**: 423
[220] Wong J Y, Langer R, Ingber D E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, **91**: 3201
[221] Heller R. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1995, **36**: 83
[222] Euler H V, Strahle K, Yongqing G. *Bioelectrochemistry*. 2004, **62**: 57
[223] 张先恩著. 生物传感技术原理与应用. 吉林: 吉林科学出版社, 1990. 3
[224] Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. *Nature*. 2001, **414**: 98
[225] Streuli C. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1999, **11**: 634
[226] Luong J H T, Habibi-Rezaei M, Meghrous J et al. *Anal. Chem*. 2001, **73**: 1844
[227] Anselme K. *Biomater*. 2000, **21**: 667
[228] Kooten,T G V, Schakenraad J M, Mei H C van der et al. *Biomater*. 1992, **13**: 897
[229] Shelton R M, Rasmussen A C, Davies J E. *Biomater*. 1988, **9**: 24
[230] Lee J H, Jung H W, Kang I K et al. *Biomater*. 1994, **15**: 705
[231] Curtis A S G, Wilkinson C, Wojciak-Stotchard B. *Cell. Eng*. 1995, **1**: 35
[232] Steele J G, Johnson G, Underwood P A. *J. Biomed. Mater. Res*. 1992, **26**: 861
[233] Claase M B, Olde Riekerink M B, Bruijn J D D et al. *Biomacromolecules*. 2003, **4**: 57
[234] Brauns S, Rappoport S, Avnir D. *Mater. Lett*. 1990, **10**: 1
[235] Horisberger M. *Trends Biochem. Sci*. 1983, **8**: 395
[236] Brown K R, Fox A P, Natan M J. *J. Am. Chem. Soc*. 1996, **118**: 1154
[237] Shipway A N, Lahav M, Willner I. *Adv. Meter*. 2000, **12**: 993
[238] Ju H X, Liu S Q, Ge B et al. *Electroanal*. 2002, **14**: 141
[239] Jia J B, Wang B Q, Wu A G et al. *Anal. Chem*. 2002, **74**: 2217
[240] Gu H Y, Sa R X, Yuan S S et al. *Chem. Lett*. 2003, **32**: 934
[241] Gu H Y, Chen Z, Sa R X et al. *Biomater*. 2004, **25**: 3445
[242] Du D, Ju H X, Zhang X J et al. *Biochem*. 2005, **44**: 11539
[243] McClary K B, Ugarova T, Grainger D W J. *Biomed. Mater. Res*. 2000, **50**: 428
[244] Kramer S, Xie H, Gaff J et al. *J. Am. Chem. Soc*. 2004, **126**: 5388
[245] Du D, Cai J, Ju H X et al. *Langmuir*. 2005, **21**: 8394
[246] Ju H X, Yan G F, Chen F et al. *Electroanal*. 1999, **11**: 124
[247] Dai Z, Chen J, Yan F et al. *Cancer Detection and Prevention*. 2005, **29**: 233
[248] Dai Z, Yan F, Yu H et al. *J. Immuno. Methods*. 2004, **287**: 13
[249] Du D, Yan F, Liu S L et al. *J. Immuno. Methods*. 2003, **283**: 67
[250] Chen J, Yan F, Dai Z et al. *Biosens. Bioelectro*. 2005, **21**: 330
[251] Dai Z, Yan F, Chen J et al. *Anal. Chem*. 2003, **75**: 5429
[252] Lin J H, Yan F, Ju H X. *Applied Biochem. Biotech*. 2004, **117**: 93
[253] Lin J H, Yan F, Ju H X. *Clin. Chim. Acta*. 2004, **341**: 109

[254] Yu H，Yan F，Dai Z et al. *Anal. Biochem*. 2004，**331**：98
[255] Lin J H，Yan F，Hu X Y et al. *J. Immuno. Methods*. 2004，**291**：165
[256] Li H N，Ci Y X，Feng J et al. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1999，**48**：171
[257] Woolley D E，Tetlow L C，Adlam D J et al. *Experimental Cell Research*. 2002，**273**：65
[258] Xiao C，Lachance B，Sunahara G et al. *Anal. Chem*. 2002，**74**：5748
[259] Torisawa Y，Kaya T，Takii Y et al. *Anal. Chem*. 2003，**75**：2154
[260] Feng J，Ci Y X，Lou J L et al. *Bioelectrochem. Bioenerg*. 1999，**48**：217
[261] 江明性. 药理学. 北京:人民卫生出版社，1989. 387
[262] Chen J，Du D，Yan F et al. *Chem-Eur J*. 2005，**11**：1467
[263] Kinsella A R，Smith D G. *Pharmac*. 1998，**30**：623